韓資植誌 20(1) : 73~78(2007)
Korean J. Plant Res.

장미화분 임성 확인을 위한 효율적인 염색법

김기준[1], 김희라[1], 이자현[1], 기광연[3], 이정현[1], 한태호[1,2], 최정근[1,2]*
[1]전남대학교 농업생명과학대학 식물생명공학부, [2]전남대학교 농업과학기술연구소, [3]전남농업기술원

Effective Identification of Rose Pollen Fertility using Staining Methods

Gi-Jun Kim[1], Hee-Ra Kim[1], Ja-Hyun Lee[1], Gwang-Yeon Gi[3], Jeong-Hyun Lee[1], Tae-Ho Han[1,2] and Jeong-Keun Choi[1,2]*
[1]Division of Plant Biotechnology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju Korea
[2]Institution of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju Korea
[3]Department of Horticulture, Jeonnam Agricultural Research and Extention Services, Naju 520-715, Korea

Abstract - Efficient pollination needs abundant fertile pollen in rose breeding. This study was performed to find out efficient staining methods for the detection of fertile pollen. Aceto-carmine and Alexander's stain gave similar results in terms of percentage of normal pollen. Fluorochromatic reaction (FCR) showed the lowest normal pollen percentage because FCR stained only fertile pollen while others stained cytoplasm. Toluidine blue O (TB) showed similar percentage of normal pollen to Aceto-carmine and Alexander's, but could not clearly distinguish the clustered abnormal pollens. Alexander's stain was easy and simple, but difficult to distinguish fertile and infertile pollen. FCR showed only fertile pollen. Alexander's stain showed approximate fertility and FCR showed exact pollen fertility.

Key words - Alexander' s stain, Fluorochromatic reaction (FCR), Fertile pollen, Rose breeding

서 언

장미는 국내 · 외 화훼품목 중에서 시장점유율 1위인 품목이다. 주요한 외국의 장미육종회사들이 국내에서 판매되는 품종들에 대한 로열티를 요구하여 효율적인 국산 품종개발의 필요성이 더욱 요구되고 있다(한국농촌경제연구원, 2003). 또한 국내 장미 품종의 개발역사가 짧은 관계로 다양한 육종 방법과 기초자료 수집이 요구되고 있다.

전통적인 교배를 통한 품종개발이 장미 품종개발의 주요 방법이다. 고효율의 교배 결실을 위해서는 활성이 강한 정상화분의 확보가 필수적이다(Cole and Melton, 1986; Khosh-Khui *et al.*, 1976; Marcellan and Camadro, 1996). 화분의 활성을 정확히 검증하기 위해서는 염색액을 사용하여 광학현미경 하에서 관찰을 하거나 화분관 발아실험을 하여 그 결과를 통하여 화분의 활성을 알 수 있다.

*교신저자(E-mail) : cjk326@empal.com

염색액은 목적에 따라 다양하게 사용을 할 수 있으며 화분의 활성을 확인하기 위해서는 Alexander's와 fluorochromatic reaction(FCR)이 주로 사용되고 있다(Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970). FCR은 형광현미경과 필터가 구비되어야 하며 Alexander's는 광학현미경으로 관찰이 가능하나 살아있는 화분선발에는 한계가 있다. Alexander's는 세포질이 있으면 죽은 세포와 살아있는 세포의 구별이 없이 적색을 나타내므로 살아있는 화분을 정확히 구별하기 위해서는 FCR test를 해야 한다.

쉽게 구할 수 있는 염색액으로 Aceto-carmine과 Toluidine Blue O(TB)가 있으며 화분 관찰의 경험이 있는 실험자라면 이러한 염색액으로도 정상화분과 비정상화분의 구별은 가능하나 Alexander's 염색액에 비해 정상화분과 비정상화분의 구별이 어렵다. Alexander's 염색액은 정상화분은 적색으로 비정상화분은 녹색으로 구별이 가능하기에 초심자도 정상화분의 선별이 가능하나 Aceto-carmine과 TB는 색으로 구별하는 데 어려움이 있다.

FCR의 경우 쉽게 접근할 수 있는 광학현미경에 비해 형광현미경 장비가 갖추어져 있어야 하고 형광의 특성상 시간이 지남에 따라 발광도가 현저히 차이가 나므로 시간적인 제약이 있다(Fig. 1). 이에 비해 형광현미경이 필요 없는 Alexander's 염색액을 이용한 실험에서는 시간적인 제약에서 유리하다. 또한 염색액에 글리세롤이 있어 비교적 오랜 기간을 보관할 수 있다. 냉장보관 시 슬라이드는 한 달 이상 지난 뒤에도 관찰이 가능하며 동일한 결과를 유출해 낼 수가 있다.

본 연구는 위와 같은 사용상의 편리성을 지닌 Alexander's 염색액과 살아있는 화분을 알 수 있는 FCR 염색액을 이용하여 얻은 화분 임성측정 결과를 바탕으로 살아있는 정상화분의 비율을 정확히 도출할 수 있는 근거를 마련 하고자한다.

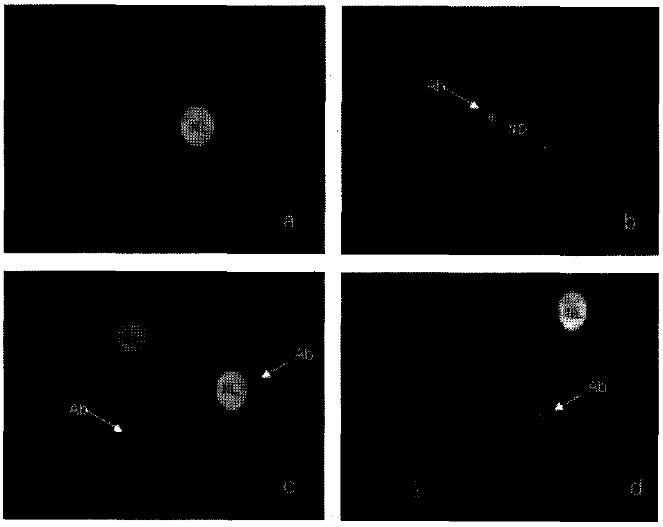

Fig. 1. A criterion for live or dead normal pollen and abnormal dead pollen in FCR.
(a) One live normal pollen (green fluorescent) (200x), (b) One dead normal pollen and one dead abnormal pollen (200x), (c) Two live normal pollen (green fluorescent) and two dead abnormal pollen (200x), (d) One live normal pollen (green fluorescent), one dying normal pollen(faint green fluorescent), two dead normal pollen, and one dead abnormal pollen (200x).
Ab: Abnormal pollen, D: Dying normal pollen, ND: Dead normal pollen, NL: Live normal pollen identified with FCR test.

재료 및 방법

식물재료

장미품종 중에서 사피어(Saphir: Tantau, Germany), 스칼라(Scarla: 전남기술원, Korea), 솔레로(Sollero), 스위트 허니(Sweet Honey), 그리고 트루드 미미(Trudy Mimi: Meilland, France)의 화분을 사용하였다.

화분채취

장미 꽃잎이 피기 시작할 때 약만 따로 유리 페트리디쉬에 채취하여 30℃의 항온기에 하루 정도 넣어서 약이 벌어져 화분이 나올 수 있는 조건을 만들어 주었다. 그 후 4℃에 냉장 보관하였다. 화분 보관 시 각 페트리디쉬를 파라필름으로 밀봉하여 락앤락 플라스틱 통[HPL824, 1.6L, 하나코비(주), 서울]에 넣어 일정한 습도가 유지되도록 하였다.

염색액

Aceto-carmine, Alexander's, Fluorescin diacetate-fluorochromatic reaction(FCR), 그리고 Toluidine blue O(TB)을 사용하였다.

Aceto-carmine

채취한 화분을 Kimwipes 끝에 묻힌 후에 슬라이드의 표면에 골고루 떨어뜨린다. 염색액을 커버글라스의 크기에 따라 30~60㎕를 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮고 염색액이 충분히 화분에 침투된 후에 관찰을 한다. 약 3분 정도 지난 후에 관찰하면 염색액은 충분히 침투가 되어있었다. 커버글라스를 덮으면서 생긴 공기를 제거하기 위해서 커버글라스를 덮고 열고를 반복하면서 기포를 제거한다.

Chromatin과 염색체가 적색을 나타내며 적색을 띠는 화분을 정상화분으로, 그 외의 화분은 비정상으로 구별하였으며 각 품종당 500개 이상의 화분을 조사하였다(Fig. 2, Fig. 3). 정상화분과 비정상을 구분하여 수를 세었으며 화분 전체에 대한 정상화분율을 구하였다.

Alexander's

Aceto-carmine과 같은 방법으로 슬라이드를 준비한 후 화분을 관찰한다. 화분벽의 두께에 따라 빙초산의 양을 1~4㎖ · $ℓ^{-1}$으로 조절해준다(Alexander, 1969). 화분벽이 얇은 경우 1㎖의 빙초산을, 중간정도의 화분벽에는 2㎖, 그리고 두꺼운 화분벽이나 spiny-walled 화분에는 3㎖의 빙초산을 첨가한다.

화분벽은 녹색을 띠며 세포질은 자주색을 보인다(Fig. 2, Fig. 3). 자주색을 띠는 구형의 화분을 정상화분으로 그 외는 비정상으로 구별하여 각 품종당 500개 이상의 화분을 조사하였다. 정상화분과 비정상을 구분하여 수를 세었으며 화분 전체에 대한 정상화분율을 구하였다.

Fluorescin diacetate-fluorochromatic reaction (FCR test)

Aceto-carmine과 같은 방법으로 슬라이드를 준비한 후 화분을 관찰한다. 염색액은 화분을 관찰하기 전에 새로 만들어 신

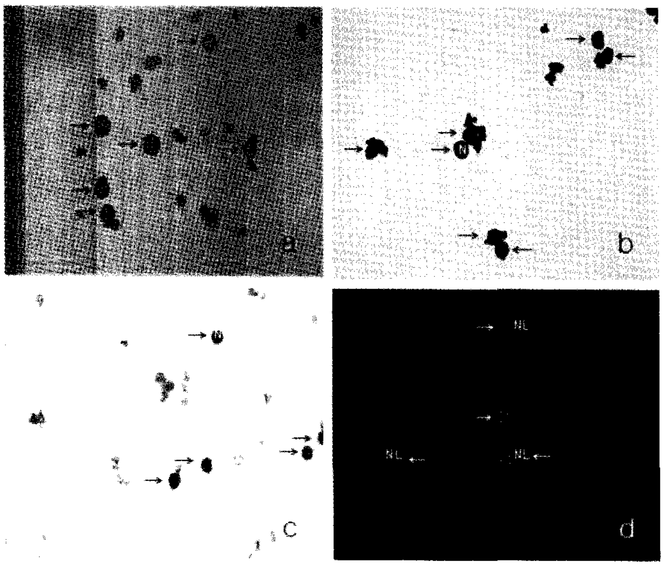

Fig. 2. Normal or abnormal pollen with various stain in rose Saphir.
(a) Aceto-carmine (six normal pollen) (100x), (b) Toluidine Blue (seven normal pollen) (100x), (c) Alexander's (five normal pollen) (100x), (d) FCR (four live normal pollen) (100x). Arrows show normal pollen.
N: Normal pollen, NL: Live normal pollen identified with FCR test.

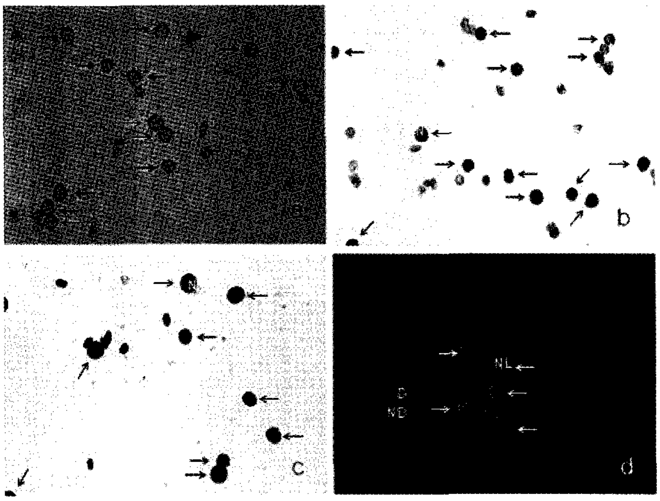

Fig. 3. Abnormal or normal pollen with various stain in rose Trudy Mimi. (a) Aceto-carmine (twelve normal pollen) (100x), (b) Alexander's (thirteen normal pollen) (100x), (c) Toluidine Blue (nine normal pollen) (100x), (d) FCR (five live normal pollen) (100x). Arrows show normal pollen.
D: Dying normal pollen, ND: Dead normal pollen, NL: Live normal pollen identified with FCR test.

선한 것을 사용한다. 이 염색액은 상온에서 약 15분 정도가 경과하면 사용을 할 수 없다. 10% sucrose액에 아세톤에 녹인 fluorescein diacetate을 염색액이 뿌옇게 될 때까지 넣어서 희석한다(Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970). 화분 배양액(10% sucrose) 5㎖에 약 150~300㎕의 fluorescein diacetate(2mg/㎖) 아세톤 용액(-20℃ 보관)을 넣는다. 살아있는 화분에서만 형광을 발산하므로 형광현미경 하에서 UV필터나 GFP필터를 사용하여 관찰한다. 화분의 활성에 따라 약한 형광에서 강한 형광까지 다양한 화분을 관찰 할 수 있으며 어느 정도 이상을 살아있는 화분으로 표시할 것인가를 결정하여야 한다. 형광을 발하는 화분을 살아있는 정상화분으로, 그 외의 화분은 죽거나 비정상으로 구별하고 각 품종당 500개 이상의 화분을 조사하였다. 그림 1에 살아있는 정상화분과 죽은 정상화분을 보면 살아있는 화분에서 형광이 강하고 죽은 화분에서는 형광이 없다(Fig. 1). 죽어가는 화분은 죽은 화분으로 간주하였다. FCR은 살아있는 정상화분을 정상(normal)으로 표시하였고 죽었거나 비정상은 비정상(abnormal)으로 표시하였다(Fig. 2; Fig. 3). 정상화분과 비정상을 구분하여 수를 세었으며 화분 전체에 대한 정상화분율을 구하였다.

Toluidine blue O (TB)

Aceto-carmine과 같은 방법으로 슬라이드를 준비한 후 화분을 관찰한다. 원래의 염색법에는 30~120초 동안 염색액을 처리한 후 30초 동안 물로 헹구어서 광학현미경 하에서 관찰하게 되어 있으나 이렇게 하려면 화분을 슬라이드에 고정해야 하므로 염색액을 25~50배로 희석하여 사용하였다(Feder and O'Brien, 1968). 화분벽은 청록색을 띠며 핵은 청색이나 녹색으로 세포질은 붉은 보라색을 띤다(Fig. 2, Fig. 3). 보라색을 띠는 구형의 화분을 정상화분으로 그 외의 화분은 비정상으로 구별하여 각 품종당 500개 이상의 화분을 조사하였다. 정상화분과 비정상을 구분하여 수를 세었으며 화분 전체에 대한 정상화분율을 구하였다.

광학현미경

현미경은 Leica DM LS2(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)이며 형광 관찰을 위해 3 lambda fluorescence illuminator를 이용하였으며 Excitation filter로 UV와 GFP를 사용하였다. Alexander's, TB, Aceto-carmine은 광학 현미경으로 관찰하였으며 배율은 100배와 200배였다. FCR은 광학현미경에 형광조사장치와 필터를 이용하여 관찰하였으며 100배와 200배였다.

결 과

장미 품종별 염색법에 따른 정상화분율

Saphir 품종의 정상화분율을 조사한 결과 FCR은 10.2%,

Alexander's는 7.9%, Aceto-carmine은 8.3%, TB는 9.6%를 나타냈다. FCR과 TB에서 Alexander's와 Aceto-carmine에 비해 높게 나왔다(Fig. 2, Table 1). 전반적으로 정상화분율은 낮게 나왔으며 7.9~10.2%였다(Table 1). Alexander's에서 가장 낮은 정상화분율을 보였다. Alexander's와 Aceto-carmine이 비슷한 정상화분율을 보였고 FCR과 TB가 비슷한 정상화분율을 보였다.

조사한 여러 품종 중에서 Scarla 품종이 살아있는 정상화분율(FCR test)과 정상화분율(FCR test 이외의 염색)에서 차이가 가장 컸다. 다른 품종의 화분에 비해 죽은 정상화분이 많았다. FCR test의 경우 죽은 화분은 형광을 나타내지 않으므로 쉽게 구별이 가능하다. 정상화분율은 20.3~45.8%였다(Table 1). 정상화분율에서 최대치와 최소치의 차이가 다른 품종에 비해 크게 났으며 약 25%의 차이를 보여주었다. FCR에서 가장 낮은 20.3%의 살아있는 정상화분율을 보였고 Alexander's는 약 46%의 정상화분율을 보여 염색액 중에서 가장 높았다. Aceto-carmine과 TB도 42% 정도로 높은 정상화분율을 나타냈다.

관찰한 여러 품종의 화분들 중에서 Sollero 품종의 정상화분율이 45.7~56.8%로 가장 높았다(Table 1). 염색법중에 FCR을 이용해 조사한 것에서 가장 낮은 약 46%의 살아있는 정상화분율을 보였다. 그러나 Alexander's는 가장 높은 약 57%의 정상화분율을 보였고 그 다음으로 Aceto-carmine이 55.3%, TB는 52.2%의 정상화분율을 보였다. FCR을 이용한 살아 있는 정상화분율을 조사할 때 다른 염색액에 비해 6~11% 낮게 나타났다. 그러나 다른 품종에 비해서는 정상화분율이 높게 나타났다.

Sweet Honey 품종은 다른 품종에 비하여 3.4~6.3%로 정상화분율이 가장 낮았다(Table 1). FCR을 이용한 조사에서 살아있는 정상화분율은 약 3.5%로, Alexander's는 약 4.6%의 정상화분율을, Aceto-carmine은 4.1%, TB는 6.3%의 정상화분율을 보였다. 이와 같이 너무 낮은 정상화분율을 가진 품종을 부친으로 교배를 하였을 때 효율이 떨어질 것으로 예상되므로 가능한 한 이 계통은 모친으로 교배를 하는 것이 유리하리라 사료된다.

Trudy Mimi 품종의 정상화분율은 32.3~41.9%를 보였다(Fig. 3, Table 1). 정상화분율은 FCR에서 약 32%, Alexander's와 TB는 약 42%, Aceto-carmine은 약 40%의 정상화분율을 보여 Alexander's와 TB 염색법에서 정상화분율이 가장 높게 나타났다.

고 찰

장미 100여 품종의 화분을 채취하여 Alexander's를 이용하여 정상화분율을 조사하여(자료 미제시) 0~10% 정상화분율을 보였던 장미 두 품종(Saphir와 Sweet Honey), 40~50% 정상화분율을 보였던 장미 두 품종(Scarlar와 Trudy Mimi)과 50% 이상의 정상화분율을 보였던 장미 한 품종(Sollero)을 선발하여 4가지의 염색액을 가지고 정상화분율을 조사한 바 예상한 대로 FCR test에서 가장 낮은 살아있는 정상화분율을 보여주었다(Table 1). Saphir 품종에서 FCR의 살아있는 정상화분율이 다른 염색액에 비해 0.6~2.2% 높게 나왔다. FCR 조사치가 높게 나온 이유는 비정상화분이 정확히 조사되지 못했기 때문으로 사료된다. Sweet Honey와 달리 Saphir는 화분을 많이 얻을 수 있다. 비정상화분이 많았으며 포도송이처럼 뭉쳐있는 화분이 많았다. 이러한 비정상화분을 잘못 조사하여 비정상화분의 수가 적어지면 정상화분율이 올라가게 된다.

FCR과 TB는 염색액의 조성상 Alexander's와 Aceto-carmine염색액에 비해 약점을 가지고 있다. 후자가 빙초산을 공통으로 가지고 Alexander's는 페놀을 함유한다(Alexander, 1969; Feder and O'Brien, 1968; Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970). 이러한 특성으로 해서 후자는 비교적 정확한 결과를 보여준다. 정상화분율은 비정상화분과 정상화분의 수를 센 다음 그 결과를 바탕으로 비율을 결정하게 된다. 이러한 이유로 비정상화분이 잘 퍼지지 못하든가 다른 이유로 정확히 자료에 포함이 되지 않으면 결과가 달라질 수 있다.

FCR은 매우 민감한 염색액이다. 이 시약은 효소에 반응하여 형광을 발하게 되므로 효소가 나올 때까지 기다린 후에 관찰을

Table 1. Percentage of normal pollen with various stains in rose varieties

Cultivar Name	FCR		Alexander's		Aceto-carmine		TB	
	Live%[z]	SD[y]	Normal%[x]	SD	Normal%	SD	Normal%	SD
Saphir	10.2	5.7	7.9	2.0	8.3[y]	239	9.6[y]	3.2
Scarla	20.3	12.7	45.8	5.7	42.4	7.6	42.7	6.4
Sollero	45.7	20.3	56.8	10.7	55.2	12.1	52.2	9.2
Sweet Honey	3.4	6.2	4.6	6.4	4.1	4.6	6.3	4.1
Trudy Mimi	32.3	14.5	41.9	11.9	40.1	12.1	41.8	9.6

[z]Live% = {live pollen/(live pollen + dead pollen)} × 100.
[y]SD: Standard deviations.
[x]Normal% = {normal pollen/(normal pollen + abnormal pollen)} × 100.

시작해야 하고 관찰을 하는 동안에도 형광이 점점 약해질 수 있다는 사실을 알고 가능한 빨리 관찰을 마무리해야 한다 (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison, 1970). 죽어가는 화분에서도 형광이 감지되기에 살아있는 화분에 대한 기준을 읽혀야 한다. 살아있는 화분은 활성이 강해 형광현미경 하에서 쉽게 구분되나 죽어가는 화분도 형광을 발하므로 죽은 화분과 살아있는 화분의 기준이 중요하다(Fig. 1). 이러한 기준을 정할 때 Alexander's를 통하여 얻은 결과가 기준이 될 수 있을 것이다 (Alexander, 1969). 그 이유는 Alexander's는 세포질이 있으면 죽은 화분이나 살아있는 화분이 모두 적색으로 보이므로 Alexander's보다 FCR에서 살아있는 정상화분율이 높게 나왔다면 관찰을 잘못한 것이다. 죽은 화분에서는 형광이 나올 수 없기때문에 FCR test에서 형광을 관찰할 수 없다. FCR염색액을 통한 살아있는 화분의 관찰에서 둥근 원형이 아닌 굴곡진 화분에서 형광이 보인다면 형광현미경이나 필터를 잘 살펴보고 확인해야 한다. 이러한 화분은 Alexander's에서 녹색으로 보일 것이며 비정상으로 죽은 화분이기에 효소가 없어서 FCR에서 형광을 발할 수 없다. 이러한 FCR과 Alexander's염색액을 이용하여 화분관 발아 실험을 통하지 않고도 살아있는 임성이 있는 정상화분의 관찰이 가능하다(Koncalova, 1975; Visser *et al.*, 1977a; Voyiatzi, 1995).

화분은 관리를 잘하지 못하면 임성이 떨어진다. 수분과 온도는 중요한 역할을 하며 이에 따라 화분의 활성은 서서히 또는 급격히 떨어질 것이다(Aylor, 2004; Fonseca and Westgate, 2005; Khosh-Khui *et al.*, 1976; Marcellan and Camadro, 1996; Marchant *et al.*, 1993; Ortiz *et al.*, 1999; Parantainen and Pulkkinen, 2002; Rajasekharan and Ganeshan, 1994; Vaknin *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 1977b). 효과적인 수분(pollination)을 위해서 채취한 화분의 활성을 주기적으로 알아보는 것은 이러한 이유에서 중요하다. 이러한 경우에 FCR은 화분 활성에 대한 정확한 정보를 제공할 것이다. Alexander's는 정상화분이 외부의 조건이나 시간의 경과에 따른 변화로 죽거나 죽어가는 화분을 구별할 수는 없으나 형광현미경 없이도 할 수 있는 방법이므로 유용하다. 비교적 관찰이 쉽고 오랜 시간 보관이 가능한 Alexander's를 통해 1차적으로 정상화분율을 조사하고 이를 토대로 살아있는 화분율을 알아보기 위해 FCR test를 이용한다면 시간과 노동력을 줄일 수 있으며 정확한 화분의 임성예측이 가능할 것이다.

사 사

이 논문은 교육인적자원부 지방연구중심대학 육성사업(바이오하우징 연구사업단)의 지원에 의하여 연구되었음.

적 요

교배효율의 증대를 위해서는 정상화분의 확보가 선행되어야 하며 화분의 활성을 파악할 필요가 있다. 본 연구에서는 화분의 활성을 확인하기 위해 여러 가지 염색액을 사용하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. Aceto-carmine과 Alexander's 염색액을 사용한 실험에서 비슷한 정상화분율을 얻을 수 있었고 FCR염색으로 관찰한 결과 살아있는 화분만 정확히 선별해 주기에 가장 낮은 정상화분율을 얻을 수 있었다. TB는 화분의 상태에 따라 달랐으나 Aceto-carmine과 Alexander's 염색액을 사용한 실험에서의 결과와 비슷한 양상을 보였다. 화분 관찰의 경험이 별로 없는 실험자도 쉽게 접근할 수 있는 염색액은 Alexander's 이었다. 정확한 화분의 활성을 조사하는 데에는 FCR이 필수이다. 형광현미경 장치 없이 정상과 비정상화분의 구별이 용이한 Alexander's 염색액으로 관찰한 자료를 바탕으로 살아있는 정상화분율의 예견이 가능하나 정확한 임성을 확인하려면 추가로 FCR test를 해야 한다.

인용문헌

Alexander, M.P. 1969. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. Stain Technol. 44: 118-122

Aylor, D.E. 2004. Survival of maize (*Zea mays*) pollen exposed in the atmosphere. Agri. Forest. Meteorogy 123: 125-133

Cole, P. and B. Melton. 1986. Self- and cross-compatibility relationships among genotypes and between ploidy of the rose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111: 122-125

Feder, N. and T.P. O'Brien. 1968. Plant micro-technique; some principles and new methods. Am. J. Bot. 55: 123-142

Fonseca, A.E. and M.E. Westgate. 2005. Relationship between desiccation and viability of maize pollen. Field Crops Research 94: 14-125

Heslop-Harrison, J. and Y. Heslop-Harrison. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Technol. 45: 115-120

Khosh-Khui, M., A. Bassiri and M. Niknejad. 1976. Effects of temperature and humidity on pollen viability of six rose species. Can. J. Plant Sci. 56: 517-523

Koncalova, M.N. 1975. Studies in rose pollen I. *In vtro* germination of pollen grains of *Rosa hugonis*. Preslia, Praha 47: 22-25

Marcellan, O.N. and E.L. Camadro. 1996. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. Sci. Hort. 67: 101-104

Marchant, R., J.B. Power, M.R. Davey, J.M. Chartier-Hollis and P.T.

Lynch. 1993. Cryopreservation of pollen from two rose cultivars. Euphytica 66: 235-241

Ortiz, R., N. Vorsa, L.P. Bruederle and T. Laverty. 1999. Pollen viability in natural populations of tree north American dipoid species of blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). Sci. Hort. 80: 39-48

Parantainen, A. and P. Pulkkinen. 2002. Pollen viability of scots pine (*Pinus sylvestris*) in different temperature conditions: high levels of variation among and within latitudes. Forest Eco. Manage. 167: 149-160

Rajasekharan, P.E. and S. Ganeshan. 1994. Freeze preservation of rose polllen in liquid nitrogen: Feasibility, viability and fertility status after long-term storage. J. Hort. Sci. 69: 565-569

Vaknin, Y., D. Mills and A. Benzioni. 2003. Pollen production and pollen viability in male jojoba plants. Idustrial Crops Products 18: 117-123

Visser, T., D.P. De Vries, G.W.H. Welles and J.A.M. Scheurink. 1977a. Hybrid tea-rose pollen. I. Germination and storage. Euphytica 26: 721-728

Visser, T., D.P. De Vries, G.W.H. Welles and J.A.M. Scheurink. 1977b. Hybrid tea-rose pollen. II. Inheritance of pollen viability. Euphytica 26: 729-732

Voyiatzi, C.I. 1995. An assessment of the *in vitro* germination capacity of pollen grains of five tea hybrid rose cultivars. Euphytica 83: 199-204

한국농촌경제연구원. 2003. 장미품종 로열티 권리화 대응방안 연구. 농림부

(접수일 2006. 10. 27 ; 수락일 2006. 12. 18)