

BAZI MEYVE TÜRLERİNDE DNA İZOLASYON YÖNTEMLERİNİN ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Özhan ŞİMŞEK¹ Fırat Ege KARAAT² Sedat SERÇE³ Yıldız AKA KAÇAR^{1,2}
¹Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı / ADANA
²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Balcalı / ADANA
³Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü / HATAY

ÖZET

Moleküler biyoloji çalışmaları üzerinde çalışılan bitkilerden yüksek kalitede DNA izolasyonu gerektirmektedir. Bu nedenle, çalışmalarda kullanılacak bitkilerden kısa sürede ve saf olarak yüksek konsantrasyonda DNA izolasyonu son derece önemlidir. Bu çalışmada fındık, avokado, Trabzon hurması, mandarin ve portakal türlerinden, MiniPrep DNA izolasyon yöntemi ve bu yöntemin modifiye edilmiş versiyonları kullanılarak DNA elde edilmiştir. Test edilen yöntemlerde ekstraksiyon tampon çözeltileri içinde 1) yalnızca CTAB, 2) CTAB ve PVP beraber (CTAB+PVP), 3) CTAB ve SDS (CTAB+SDS) beraber ve 4) yalnızca SDS olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu izolasyon yöntemleri sonrasında elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve kaliteleri karşılaştırılmıştır. Genel olarak tüm yöntemlerden yüksek konsantrasyonda DNA elde edilirken, hem bitki türleri hem de yöntemler istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En yüksek DNA konsantrasyonları fındık ve portakal türlerinde elde edilirken CTAB+SDS yöntemi ile elde edilen DNA konsantrasyonları öteki yöntemlerden daha düşük olarak saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: DNA izolasyonu, MiniPrep, CTAB, PVP, SDS

COMPARISONS OF DNA ISOLATION METHODS FOR SOME FRUIT SPECIES

ABSTRACT

Virtually all molecular biology studied requires high quality DNA isolated from plants of interest. Therefore, it is important to isolate pure and high quality DNA in a

short time. In this study, DNA sampled from hazelnut, avocado, persimmon, mandarin and orange were isolated using MiniPrep DNA isolation methods and its modified versions. These treatments were prepared adding 1) CTAB, 2) CTAB and PVP (CTAB+PVP), 3) CTAB and SDS (CTAB+SDS) 4) SDS to extraction buffer. The DNA samples isolated using these methods were compared for their concentrations and purity. In general, all method yielded high DNA concentrations; the differences among the fruit species and the isolation methods were found to be statistically significant. The highest DNA concentrations were recovered from hazelnut and orange while CTAB+SDS yielded significantly lower DNA concentration when compared to the other methods.

Key words: DNA isolation, MiniPrep, CTAB, PVP, SDS

1. GİRİŞ

Bitkilerde moleküler biyoloji çalışmaları yüksek kalitede DNA gerektirmektedir. Kaliteli DNA gerektiren bu çalışmalar arasında bitki tür ve çeşitlerinin DNA parmak izlerinin belirlenmesi ile yapılan taksonomik çalışmalar, genetik haritalama çalışmaları, moleküler işaretleyiciler yardımıyla yapılan erken seleksiyon çalışmaları, Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) tanımlanması ve bunun gibi pek çok çalışma sayılabilir. Yüksek kalitede DNA gerektiren bu çalışmalar için öncelikli olarak çalışmalarda kullanılacak olan DNA'nın kısa sürede ve saf olarak eldesi son derece önemlidir. Bu amaçla bitkilerden DNA elde edilmesi için birçok izolasyon yöntemi geliştirilmiştir (Dellaporta vd.1985, Doyle ve Doyle 1991, Thomas vd.1993, Lodhi vd.1994, Lefort vd.1998). DNA izolasyonunda başarı; DNA'nın miktarı, DNA'nın kalitesi ve DNA'nın kullanılabilirliği ile ölçülmektedir (Aka Kaçar 2003).

Bitkilerde DNA izolasyonundan önce temin edilen dokunun korunması oldukça önemlidir. Temin edilen bitkisel dokular izolasyon sırasına kadar soğuk ve nemli yerlerde saklanmalıdırlar. Bitkisel dokuların dikkatli bir şekilde korunması izolasyon sonrası elde edilen DNA'nın kalitesini olumlu şekilde etkilemektedir.

Bitkilerden DNA izolasyonu genel olarak aşağıda belirtilen prensiplere göre yapılmaktadır; bitkisel hücrelerini, hayvansal hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri bitki hücrelerinin selülozdan yapılmış bir hücre duvarı içermesidir. Bitkilerdeki hücre duvarı, bitkisel dokunun sıvı azot ya da kuru buz içerisinde öğütülmesi ile kırılır ve böylece DNA hücre içerisinde serbest kalır. Hücre duvarı kırıldıktan sonra, CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium

Bromide), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ve PVP (Polyvinylpyrrolidone) gibi deterjanlar kullanılarak hücre zarı parçalanır. Homojen hale getirilen bitki hücresi içerisindeki DNA'ya bağlı proteinler kloroform ya da fenol karışımı eklenerek uzaklaştırılır. RNA'yı yıkan RNaz enzimi kullanılarak solüsyon içerisindeki RNA'lar uzaklaştırılır. DNA'nın saf bir şekilde elde edilmesi için etil alkol ile bir ya da birkaç defa yıkama yapılır.

DNA izolasyonu sırasında DNA'yı parçalayan enzimler için en uygun olan pH düzeyinden kaçınılmalıdır. DNA'yı parçalayan enzimler olan DNazlar pH 7,0 civarında çalışırlar (Dunham ve Bryant 1983). Bu durumda bitki ekstraksiyon bufferi pH 8,0 hatta pH 9,0 civarında olmalıdır.

Bitki hücreleri genelde çok sayıda ikincil bileşik içerirler, bunun sonucu olarak belirli türlerde yüksek düzeydeki ikincil bileşikler DNA'nın saflığını bozmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için alternatif ekstraksiyon tamponları kullanılır. Teknik ve özel sorunlara çözüm getirmek amacıyla izolasyon tamponları kullanılır (Aka Kaçar 2003).

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların saflıkları ve miktarlarının belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemler kullanılır ya da DNA agaroz jelde koşularak standart DNA'larla karşılaştırma yapılır.

Bu çalışmada değişik bitki türlerinde dört DNA izolasyon metodu kullanılarak elde edilen DNA'nın konsantrasyon ve kaliteleri karşılaştırılmıştır. Deneme kapsamında beş meyve türü kullanılsa da, sonuçların birçok meyve türünü yansıtmaması açısından test edilen meyve türleri değişik cinslerden örneklenmişlerdir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında yürütülmüştür.

Çalışmada bitkisel materyal olarak Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümüne ait fındık, avokado, trabzon hurması, mandarin ve portakal türlerine ait bitkisel materyal kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Bitkisel materyalin hazırlanması

Çalışmada kullanılan bitki çeşitlerinden temin edilen tam büyüklüğe gelmiş taze yapraklar saf su altında yıkanmış alimünyum folyo ile sarılmıştır ve ardından örnekler sıvı azot içerisine batırılmıştır. Her örnek havan içerisinde sıvı azot ile öğütülerek 0,1 g olacak şekilde 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Her örnek iki tekrarlı olacak şekilde ve dört farklı izolasyon yönteminde kullanılmak üzere toplam sekiz adet santrifüj tüpü içerisine yerleştirilmiştir.

2.2.2. DNA izolasyonu için gerekli solüsyonların hazırlanması

Bu çalışmada MiniPrep DNA izolasyon yöntemi ve yöntemin modifiye edilmesi ile toplam dört farklı izolasyon yöntemi denenmiştir. DNA izolasyonunda kullanılan ekstraksiyon tampon çözeltilerin içerisinde yer alan deterjanlar değiştirilerek yöntemin modifikasyonu sağlanmıştır. Ekstraksiyon tampon çözeltileri içlerine CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide), CTAB ve PVP (Polyvinyl prolidone) beraber, CTAB ve SDS (Sodium dodecyl sulphate) beraber ve yalnızca SDS olacak şekilde hazırlanmıştır. DNA izolasyonunda kullanılan tampon çözeltilerin içerikleri Çizelge 1, Çizelge 2, Çizelge 3 ve Çizelge 4'de sunulmuştur. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltiler dışında kloroform : izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1 M PH:8, EDTA: 0.5 M PH:8), RNase A (10 mg/ml) solüsyonu, izopropanol ve etil alkol (%99) kullanılmıştır.

2.2.3. DNA izolasyon aşamaları

Sıvı azot ile ezilmiş bitki dokularının bulunduğu tüplerin her birine 396 µl hazırlanan ekstraksiyon solüsyonu ve 4 µl β-merkaptoetanol pipet yardımıyla eklenerek karıştırılmıştır. Tüpler 65 °C'de 20 dakika bekletilmiş ve bu süreçte iki defa karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Sonrasında, herbirine 400 µl kloroform: izoamilalkol eklenerek 15 dakika süreyle karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Tüp içerisindeki karışım 13.000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bekleme sırasında her örnek için yeni temiz bir santrifüj tüpü hazırlayıp etiketlenmiştir ve her birinin içine 400 µl soğuk (-20 °C) izopropanol eklenmiştir. Santrifüj tamamlandığında tüplerin üst kısmındaki sıvı kısımdan 400 µl steril pipet aracılığıyla soğuk (-20

°C) izopropanol içeren santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 1 saat süreyle -20 °C'de bekletilmiştir. Beş dakika 13.000 devir/dakika'da santrifüj edilen tüplerdeki üst sıvı dökülmüştür. Çökeltinin kuruması için tüpler kağıt havlu üzerine ters bırakılarak bekletilmiştir. Kuruyan çökelti 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür. Her tüpe 4 µl RNase A eklenmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında tüpler bekletilmiştir. Her tüpe 500 µl soğuk ETOH (%99) eklenmiştir ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle -20 °C de bekletilmiştir. Beş dakika 13.000 devir/dakika'da santrifüj edilmiştir.

2.2.4. DNA konsantrasyonu ve kalitesinin belirlenmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND 100) ölçümler yapılarak belirlenmiştir.

DNA'lar %0,7'lik agaroz jelde, 1x TAE (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8,0) tamponu ile yürütülmüştür. Jel %0,5 µg/ml oranındaki ethidium bromide solüsyonu ile boyanmış ve UV altında fotoğrafları çekilerek DNA miktar ve kalitesi tespit edilmiştir.

2.2.5. PCR reaksiyonlarının hazırlanması

İzole edilen DNA'lar OPAI-08 RAPD primeri (Operon) kullanılarak PCR reaksiyonları ile amplifiye edilmiştir.

Çizelge 1. DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan 1 no'lu Ekstraksiyon Tampon Çözeltisinin İçeriği.

Solüsyon	Konsantrasyon
CTAB	% 2,0
NaCl (5 M)	1,4 M
EDTA (0,5 M) pH 8,0	0,2 M
TRIS-HCl (1 M) pH 8,0	0,1 M

Çizelge 2. DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan 2 no'lu Ekstraksiyon Tampon Çözeltisinin İçeriği.

Solüsyon	Konsantrasyon
CTAB+PVP	% 2,0
NaCl (5 M)	1,4 M
EDTA (0,5 M) pH 8,0	0,2 M
TRIS-HCl (1 M) pH 8,0	0,1 M

Çizelge 3. DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan 3 no'lu Ekstraksiyon Tampon Çözeltisinin İçeriği.

Solüsyon	Konsantrasyon
CTAB+SDS	% 2,0
NaCl (5 M)	1,4 M
EDTA (0,5 M) pH 8,0	0,2 M
TRIS-HCl (1M) pH 8,0	0,1 M

Çizelge 4. DNA İzolasyon Yönteminde Kullanılan 4 no'lu Ekstraksiyon Tampon Çözeltisinin İçeriği.

Solüsyon	Konsantrasyon
SDS	% 2,0
NaCl (5 M)	1,4 M
EDTA (0,5 M) pH 8,0	0,2 M
TRIS-HCl (1M) pH 8,0	0,1 M

PCR reaksiyon karışımı toplam 12 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu karışım; 2x PCR Master Mix (Fermantas K0171), 1 ünite DNA Taq Polimeraz (Fermantas, EP0402), MgCl₂, 30 ng primer, 15 ng genomik DNA ve ddH₂O'dan oluşmaktadır. PCR programı; 2 dakika 94°C'de ön denatürasyon, ve ardından toplam 45 döngü olacak şekilde 2 dakika 94 °C'de denatürasyon, 1 dakika 37 °C'de primerin bağlanması, 2 dakika 72 °C'de

DNA ürününün uzaması, ve 35 döngüyü takiben 10 dakika 72 °C'de son DNA ürününün uzaması şeklinde uygulanmıştır. PCR ürünleri 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

PCR ürünleri % 1,5'lik agaroz jelde 3 saat süreyle 70 voltta 1X TAE (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH:8,0) buffer eklenerek yürütülmüştür. Jel % 0,5 µg/ml oranındaki Ethidium bromid solüsyonu ile boyanmış ve UV altında fotoğrafları çekilerek DNA bant profilleri görüntülenmiştir.

2.2.6. Verilerin istatistik analizi

Faktöriyel deneme desenine göre kurulan bu çalışmada elde edilen veriler SAS programı (SAS, 1990) kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonucunda istatistiksel olarak önemli bulunan faktörlerin ortalama karşılaştırmaları LSD yöntemine göre 5% önem düzeyinde yapılmıştır.

3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan türler incelendiğinde uygulanan dört yöntemde de DNA miktarları oldukça yüksek bulunmuştur. Varyans analizi DNA konsantrasyonu bakımından hem meyve türlerinin hem de izolasyon yöntemlerinin istatistiksel olarak farklı olduklarını göstermiştir (Çizelge 5). Ancak, tür x yöntem interaksyonu önemli bulunmamıştır. Bu durum test edilen meyve türlerinin, izolasyon yöntemine tepkilerinin benzer olduğunu göstermektedir. En yüksek DNA konsantrasyonları fındık (3103 ng DNA / µL) ve portakaldan (3098 ng DNA / µL) elde edilirken en düşük konsantrasyonlar avokado (2367 ng DNA / µL) ve mandarinden elde edilmiştir (2582 ng DNA / µL). Yöntemler genelde birbirlerine benzer sonuçlar verirken CTAB + SDS yöntemi (2139 ng DNA / µL) diğer yöntemlere oranla (genel ortalama = 2786 ng DNA / µL) daha düşük DNA konsantrasyonu üretmiştir.

DNA'nın saflığını ölçmek için genel olarak 260 ve 280 nm absorbiyon değerleri oranları kullanılmakta; 1,80-2,00 arasındaki oranların saflığı yüksek olarak değerlendirilmektedir. DNA saflığıyla değerlendirilen kalite sonuçlarında, meyve türleri arasındaki farklılıklar ve interaksyon önemli bulunmamıştır. DNA konsantrasyonlarında olduğu gibi, yöntemler arasındaki farklılıklar ise önemli bulunmuş, genotiplerden en yüksek değerler CTAB ve CTAB + SDS yöntemlerinden elde edilmiştir (Çizelge 6). Bu ortalama grubu

(2,08) ideal değerlerden yüksektir. İdeal değerlere en yakın sonuç ise SDS uygulamasından elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan dört farklı yöntem ile elde edilen DNA'ların agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 1'de sunulmuştur.

Yukarıda açıklanan yöntemlerden elde edilen DNA'lar OPAI-08 RAPD primeri kullanılarak PCR reaksiyonları ile amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilmiş DNA örneklerinin agaroz jelde koşularak elde edilen bantların istenilen nitelikte kaliteli olduğu belirlenmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında DNA izolasyon aşaması son derece önemlidir. PCR uygulamalarında ise DNA'nın miktar ve özellikle saflığı amplifikasyon açısından daha da önem kazanmaktadır (Ergül 2000). Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir DNA izolasyonu başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. Çalışmada kullanılan türlere ait DNA'lar incelendiğinde DNA miktarları oldukça yüksek bulunmuştur.

DNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli DNA'larda saflığın A260/A280 oranının yaklaşık 2,0 civarında bulunması beklenmektedir. Elde edilen değerler 2,0'den yüksek olması; örneğin RNA, kloroform ya da fenol ile kirli olduğunu ve 1,6 değerinden düşük olması ise örnek içerisinde proteinler ya da fenolik (polifenol) bileşikler bulunduğunun göstergesidir (Hoisington 1992). Bu çalışmada uygulanan dört yöntemde elde edilen DNA saflık oranları 1,85-2,12 arasında bulunmuştur.

İzolasyonlar sonucu elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüleri incelendiğinde DNA'ların tek bant oluşturdukları görülmektedir. Tek bant oluşturmuş olmaları onların RNA ve hücre sekonder ürünlerinden arı, sarmal yapılarını koruyarak parçalanmamış olduklarını göstermektedir (Karataş ve Ağaoğlu 2006).

İzole edilen tüm DNA'ların PCR uygulamalarında kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla OPAI-08 RAPD primeri kullanılarak iki tekrarlı RAPD analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda dört yöntemle de elde edilen DNA'ların bant profillerinin tekrar edilebilir olduğu belirlenmiştir.

DNA izolasyonunda, hücre zarını yıkmak amacıyla CTAB, PVP ve SDS gibi deterjan içerikli kimyasallar kullanılmak zorundadır. Bunun sebebi hücre zarının yüksek miktarda lipit içermesidir, bu lipit içeriği bu tarz deterjanlar kullanılarak aşılacaktır. Bu çalışmada farklı deterjanların DNA izolasyonunda, DNA kalitesi ve miktarındaki etkilerini belirlemek amacıyla

CTAB, CTAB ve PVP beraber, CTAB ve SDS beraber ve yalnızca SDS deterjanları kullanılmıştır.

DNA izolasyonu için uygulanan dört farklı kombinasyonda da sonuçlar benzer çıkmıştır. Yüksek miktarda ve kaliteli DNA'lar elde edilmiştir. İstatistiksel olarak CTAB+SDS yöntemi ile elde edilen DNA konsantrasyonları öteki yöntemlerden daha düşük olarak saptandığından DNA konsantrasyonları yüksek ve kaliteli DNA veren diğer üç yöntem söz konusu meyve türleri için önerilmektedir.

Çizelge 5. Denemeye Ait Varyans Analiz Tablosu.

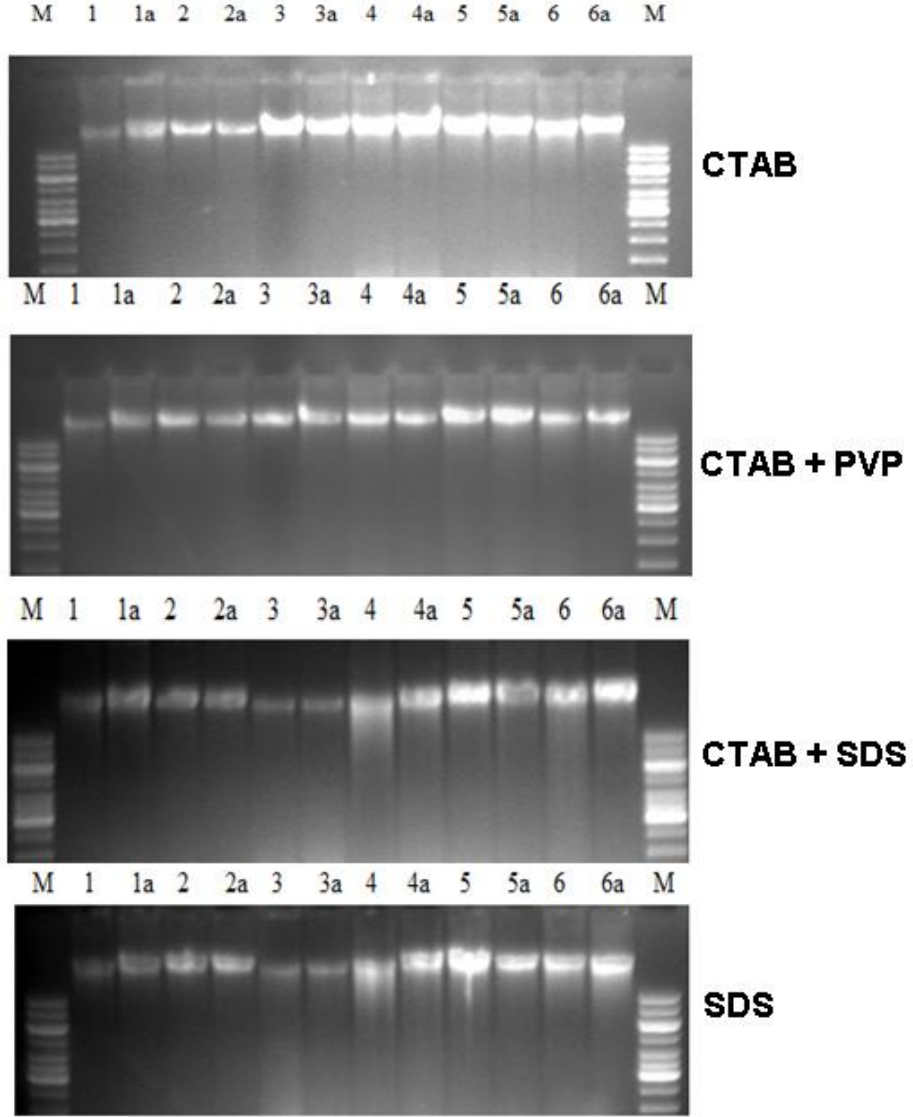
Kaynak	Serbestlik derecesi	Konsantrasyon	Kalite
Tür (T)	4	830695**	2,5
Yöntem (Y)	3	1996397**	11,1**
T x Y	12	289269	2,9
Hata	20	174266	1,9

**%5 önem düzeyinde önemli.

Çizelge 6. Denemede Elde Edilen Konsantrasyon ve Kalite Ortalamaları

Kaynak	Konsantrasyon (ng DNA / µL)	Kalite (A260/A280)
<i>Tür</i>		
Avokado	2367 ± 545 b	2,05 ± 0,07
Fındık	3104 ± 557 a	2,05 ± 0,04
Hurma	2781 ± 960 ab	2,03 ± 0,09
Mandarin	2582 ± 265 b	2,08 ± 0,02
Portakal	3098 ± 500 a	2,05 ± 0,03
LSD _{5%}	435	ö.d.
<i>Yöntem</i>		
CTAB	2852 ± 539 a	2,08 ± 0,03 a
CTAB+PVP	3132 ± 650 a	2,05 ± 0,07 ab
CTAB+SDS	2139 ± 545 b	2,08 ± 0,02 a
SDS	3022 ± 382 a	2,01 ± 0,05 c
LSD _{5%}	389	0,04
Ortalama	2786 ± 612 a	2,06 ± 0,05

ö.d. önemli değil.



Şekil 1. CTAB, CTAV+PVP, CTAB+SDS ve SDS ekstraksiyon solüsyonu ile elde edilen DNA'ların agaroz jeldeki görüntüleri. 1: fındık; 2: avokado; 3: trabzon hurması; 4: limon; 5: mandarin; 6: portakal; M: işaret. Limon türüne ait DNA örnekleri değerlendirme dışı tutulmuştur.

KAYNAKLAR

- Aka-Kaçar, Y., 2003. Bitkilerde DNA İzolasyonu. Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Dergisi 2:1-3.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B., 1983. A Plant DNA Minipreparation: Version 11. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.
- Doyle, J. J. Doyle, J. L. 1991. Isolation of Plant DNA Fresh Tissue. Focus 12:13-15.
- Dunham, V. L., Bryant, J. A., 1983. In Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells (ed. Hall, J. L. and Moore, A. L.), p.237. Academic Press, London.
- Ergöl, 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs.) genomic DNA Parmak İzi Analizi ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hoisington, D., 1992. Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Lab. Mexico, D.F. CIMMITY.
- Karataş, A., ve Ağaoğlu, Y. S., 2006. Güneydođu Anadolu Bölgesi Üzüm Çesitlerine Ait DNA'ların Miktar ve Saflıkları Üzerine Bir Araştırma. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 10:83-90.
- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D. ve Douglas, G. C. 1998. Morphological Traits Microsatellite Fingerprinting and Genetic relatedness of a Stand of Elite Oaks (*Q. robur* L.) at Tullnynally. Silvae Genetica 47:5-6.
- Lodhi, M. A., Daly, M. J., Ye, G.-N., Weeden, N. F., Reisch, B. I. 1994. A simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* species. Plant Molecular Biology Reports 12: 6-13.
- SAS Institute Inc. 1990. SAS users guide; SAS/STAT, version 6. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Thomas, M. R., Matsumoto, S., Chain, P., Scott, N.S. 1993. Repetitive DNA of Grapevine: Classes Present and Sequences Suitable for cultivar identification. Theoretical and Applied Genetics 86:173-180.