Molecular characterization of two Syrian bat species using PCR_ISSR technology

Dr.Nahla Ibrahim*
Dr.Taghreed Kgaddar**
Yara Al- Ramadan***

(Received 10 / 11 / 2024. Accepted 16 / 1 /2025)

□ ABSTRACT □

The genetic diversity of two species of Syrian bats, the fruit-eating *Rousettus aegyptiacus* and the insectivorous *Pipistrellus kuhlii*, was studied and the degree of genetic kinship between them was determined; using the Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) technique. The research was carried out in the biotechnology laboratories of the General Authority for Atomic Energy in Damascus during the year 2023/2024. We isolated DNA from the muscle tissue of two species of bats and verified its quality and quantity, then performed the polymerase chain reaction. For this purpose, 15 primers were used, 11 of which gave amplification products in the PCR reaction. These 11 primers proved effective in distinguishing between the two studied species and giving polymorphism. The use of these primers resulted in a total of (41) with an average of (3.72) bands. The total number of bands for each primer ranged between (1) band as the lowest number with primer (Oligo 9) and (9) bands as the highest number with primer (Oligo 12) with an average of (3.72) bands. The number of morphologically multiple bands was (21) with an average of (1.9) bands. The number of morphologically diverse bands for each primer ranged between (1) band as the lowest number with primer (Oligo 1, Oligo 5, Oligo 8, Oligo 9, Oligo 12, Oligo 13) and (4) bands as the highest number with primer (Oligo 6). The cluster analysis and degree of kinship showed the presence of genetic divergence between the two species at a distance of 0.67, meaning that the percentage of genetic divergence between the two studied species was 67%.

Keywords: *Roussettus aegyptiacus*, *Pipistrellus kuhlii*, ISSR.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Associate Professor, faculty of science, Tishreen university, Latakia, Syria.**
** **Assistant Professor,Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Latakia University, Lattakia, Syria**
*** **Pstgraduate student, faculty of science, Tishreen university, Latakia, Syria**

التوصيف الجزيئي لنوعين من الخفافيش السورية باستخدام تقانة PCR_ISSR

د. نهلة إبراهيم*

د. تغريد قدار**

يارا الرمضان***

(تاريخ الإيداع 10 / 11 / 2024. قبل للنشر في 16 / 1 / 2025)

□ ملخّص □

تمت دراسة التنوع الوراثي لنوعين من الخفافيش السورية آكل الفاكهة *Rousettus aegyptiacus* وآكل الحشرات , *Pipistrellus kuhlii* وتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها؛ وذلك باستخدام تقنية ما بين تكراريات التسلسلات البسيطة (Inter Simple Sequence Repeats-ISSR) نفذ البحث في مخابر التقانة الحيوية في الهيئة العامة للطاقة الذرية بدمشق خلال العام 2023/2024. قمنا بعزل الحمض الريبي النووي DNA من النسيج العضلي لنوعين من الخفافيش والتأكد من نوعيته وكميته ثم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل ، واستخدم لهذا الغرض 15 بادئة (مرنسة)، 11 بادئة منها أعطت منتجات تضخيم في تفاعل الـ PCR، وقد أثبتت هذه البادئات الـ 11 فعاليتها في التمييز بين النوعين المدروسين وإعطاء تعددية شكلية polymorphism ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه (41) بمتوسط (3.72) حزم. وتراوح عدد الحزم الكلية لكل بادئ بين (1) حزم كأقل عدد مع البادئ (Oligo 9) و(9) كأعلى عدد مع البادئ (Oligo 12) بمتوسط (3.72) حزم وبلغ عدد الحزم المتعددة شكلياً (21) بمتوسط (1.9) حزمة، وتراوح عدد الحزم المتباينة شكلياً لكل بادئ بين (1) حزم كأقل عدد مع البادئ (Oligo 1, Oligo 5, Oligo 8, Oligo 9, Oligo 12, Oligo 13) و(4) حزم كأعلى عدد مع البادئ (Oligo 6)، وقد أظهر التحليل العنقودي ودرجة القرابة وجود تباعد وراثي بين النوعين بمسافة 0.67 أي أن نسبة التباعد الوراثي بين النوعين المدروسين بلغت 67%.

الكلمات المفتاحية: *Roussettus aegyptiacus،Pipistrellus kuhlii* , ISSR.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

*أستاذ مساعد -- كلية العلوم -جامعة تشرين- اللاذقية- سوريا.

** مدرّس - قسم الطب المخبري _ كلية الطب – جامعة تشرين – اللاذقية- سوريا.

***طالبة (ماجستير)- كلية العلوم -جامعة تشرين -اللاذقية- سوريا.

مقدمة:

تعد طرائق توصيف الأنواع وتصنيفها اعتماداً على الصفات الشكلية والإنتاجية من الطرق الأكثر قدماً في التصنيف، وتتأثر غالباً بالظروف البيئية السائدة وتعطي نتائج متقاربة ومتشابهة يصعب الاعتماد عليها في تمييز الاختلافات كما أنها تتطلب وقتاً وجهداً كبيرين **(Wjhani, 2004)**.

لذا يجب دعم هذه الطرائق بطرائق التقانات الحيوية الحديثة **(Ricciardi *et al*., 2002)** في توصيف المصادر الوراثية باستخدام المؤشرات الجزيئية إذ تتميز بكثرة عددها وثباتية نتائجها وعدم تأثرها بالظروف البيئية، ويمكن استخدامها في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي **(Eleuch *et al*., 2008)**.

طور Saiki وزملاؤه **(1985)** تقانة تفاعل البوليميراز التسلسلي Polymerase Chain Reaction-PCR)) وكان لهذا التفاعل أثراً مهماً على صعيد الدراسات الوراثية الجزيئية، كما ساعد على سرعة غربلة العديد من المجموعات الانعزالية وكفاءتها، كما ساعد تصنيع أجهزة التدوير الحراري المؤتمتة Automated Cycler Thermo واكتشاف إنزيم البوليميراز Polymerase DNA على تطوير تفاعل PCR وعلى ظهور تقنيات أخرى تعتمد عليه وتستخدم في إجراء التحاليل الوراثية وإنشاء خرائط الارتباط الوراثية **(Saiki *et al*., 1988; Rafalski *et al*., 1996)**.

وتعد تقانة مابين تكراريات التسلسلات البسيطة ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) واحدة من التقانات المهمة التي تعتمد على تفاعل الـ PCR وتنتج مؤشرات جزيئية مثالية للعديد من الأسباب حيث تعمل تقانة ISSR على تضخيم منطقة ما بين تكراريات التسلسلات البسيطة حيث يمكن أن تستخدم بادئ وحيد مكون من نكليوتيدات (Nucleotides) مطابقة في تسلسلها لإحدى تكراريات التسلسلات البسيطة إما في النهاية '3 أو في النهاية '5، إذ تعد تقانة ISSR أكثر تكرارية (وذات نتائج ثابتة عند تكرارها) مقارنة بتقانة التعدد الشكلي لقطع الحمض النووي DNA المضخمة عشوائياً RAPD **(Chowdhury *et al*., 2002)**، بالإضافة إلى إمكانية الكشف عن التتاليات النكليوتيدية ذات السيادة في التوريث، ووفرتها ووجودها في جينوم حقيقيات النوى، وعدم حاجتها إلى معلومات عن التسلسل الجيني **(Kijas et al., 1995)**، كما أنها سريعة وتتطلب كمية قليلة من الحمض النووي DNA وقادرة على كشف نسبة عالية من التعددية الشكلية polymorphism بنفس قدرة تقانة تكراريات التسلسلات البسيطة SSR **(Bornet *et al*., 2002)** كما تتميز بإمكانية الأتمتة Automation إذ يمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النكليوتيدي لها.

أثبت **(Yagcı & Baydemir, 2019)** أن طريقة ISSR-PCR هي تقانة موثوقة ومفيدة للكشف عن أوجه التشابه والاختلاف الجيني بين الأنواع حيث تمت دراسة التنوع الوراثي لثلاثة أنواع من الخفافيش (*Myotis myotis* و*Myotis blythii* و*Myotis cappacini*) بوساطة تقانة ISSR للمرة الأولى وباستخدام 7 بادئات ووفقاً لنتائج هذه الدراسة تبين أن النوعين *M. myotis* و *M. blythii* قريبان وراثياً وتم تقسيم أفراد النوعين في مجموعتين متقاربتين وشكل فرد وحيد من *M. Myotis* المجموعة الثالثة والنوع *M. cappacinii* مجموعة أكثر تميزاً. تم حساب التنوع الجيني للأفراد بنسبة 94.5%.

تمت دراسة التنوع الجيني وتحديد مستوى التمايز الجيني لأربع مجموعات تنتمي للنوع *Eptesicus nilssonii* تمتد على مسافة 6km بطريقة ISSR-PCR باستخدام 6 بادئات واتضح أنها تتميز بمستوى عالٍ نسبياً من التنوع الجيني بنسبة 68.1 ٪ (عزلة انجابية محتملة) **(Baishev *et al*., 2014)**.

أهمية البحث وأهدافه:

يعد هذا البحث البحث الأول من نوعه في سورية والذي يختص بدراسة التوصيف الجزيئي لأنواع الخفافيش السورية مما سيشكل أساس لبدء العمل على إنشاء مكتبة وراثية لأنواع الخفافيش في سورية كما يعد مدخل إلى علم الوراثة الجزيئية لدى الخفافيش والتي قد تعطي تفسيرات للناحية المناعية المعروفة بتميزها عند الخفافيش.

طرائق البحث ومواده:

- **استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA Extractiom:**

تم عزل الحمض النووي من نسيج العضلات بطريقة فينول–كلوروفورم المعدلة حيث تم اقتطاع جزء من النسيج العضلي ووضع في الثلج ريثما يتم حفظه نهائياً بدرجة حرارة 80- درجة مئوية حتى البدء بالعمل وفق المراحل التالية:
قمنا بوزن 200 مغ من النسيج العضلي، ووضعت في جهاز سحق النسيج الأنسجة Stomscher 80 الشكل (1) لتليين العينات النسيجية الكثيفة كالنسيج العضلي لتخفيف تماسكها وارتباطها ثم سحقت باستخدام الآزوت السائل جيداً، ثم تم إضافة حجم واحد من محلول الهدم (50mM Tris PH=8, 100 mM Nacl, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% BME 2-mercaptoethanol)، أضفنا حجم واحد من محلول Roti phenol، مزجت العينات جيداً على الرجاجة، وثفلت بسرعة 14000دورة/ دقيقة لمدة دقيقة واحدة ثم سحب الطور المائي إلى أنبوب جديد والتخلص من الراسب والتثفيل بسرعة 14000دورة/ دقيقة ونقل الطور السائل إلى أنبوب جديد، أضيف حجم واحد من الكلوروفورم وثفلت الأنابيب بسرعة 14000دورة/ دقيقة لمدة دقيقة، تم سحب الكلوروفورم وأضيف حجمان من الإيتانول المطلق لترسيب الحموض النووية والتثفيل بسرعة 14000دورة/ دقيقة لمدة دقيقة، سحب الإيتانول، حل الرسابة في 100ulمن الماء المقطر ثم قيست العينات على جهاز قياس التراكيز النانوي لقياس تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA.

الشكل (1): جهاز سحق الأنسجة

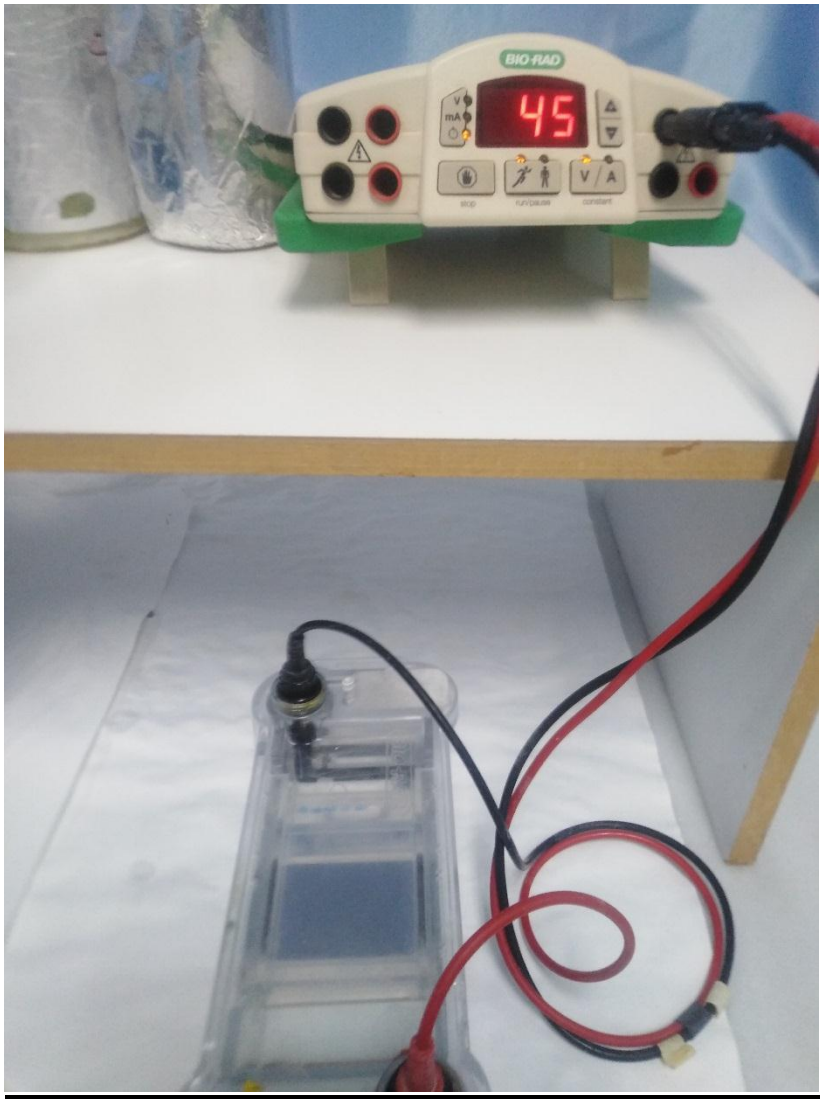
- **تقدير كمية الحمض النووي DNA ونوعيته بواسطة جهاز المطياف الضوئي والرحلان الكهربائي:**

لتقدير كمية الحمض النووي DNA في العينات تم استخدام جهاز قياس التراكيز النانوي الشكل (2) الذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجات طولها 260 و280 نانومتر. تسمح قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتر بحساب تركيز الحمض النووي nucleic acid في العينة بحيث أن كل واحد من الكثافة الضوئية Optical Density (OD) تقابل حوالي 50 ميكروغرام/مل لسلاسل الحمض النووي DNA المضاعفة، والنسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر/ 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي وخلوه من البروتين ويجب أن تتراوح هذه النسبة بين (1.8-2).

الشكل (2): جهاز قياس التراكيز النانوي

- **التقدير النوعي للحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين بواسطة الرحلان الكهربائي الأفقي:**

جرى فحص نوعية DNA وتحديد درجة تكسره بواسطة الرحلان الكهربائي الأفقي الشكل (3)، باستخدام هلامة الأغاروز بتركيز 1% مكونة من 0.5 غ أغاروز و 50 مل من المحلول المنظم 1xTAE PH=8 والمكون من (242 g Tris Base, 57 ml Acetic Acid, 100 ml 0.5 M EDTA, ddH_2O).



الشكل (3): جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي

سخن المزيج حتى ذوبان الأغاروز وأضيف له 5ul من بروميد الإيثيديوم Ethidium bromide كعلامة لصبغ الحمض النووي من أجل تحديد وتصوير نطاقات الحمض النووي في جل الرحلان الكهربائي وترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة كما استخدم محلول 1xTAE كمحلول منظم في جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي، وأجريت عملية الرحلان الكهربائي تحت جهد 90 فولت لمدة 45 دقيقة، وبعد انتهاء عملية الرحلان الكهربائي صورت الهلامة باستخدام جهاز تصوير الهلامة شركة BIORAD العالمية (BioRad Gel Documentation Systems)، الشكل (4).

الشكل (4): جهاز التدوير الحراري

- **تطبيق تقنية ISSR:**

استخدم في الدراسة بادئات تم الحصول علها من شركة Alpha DNA ويوضح الجدول الجدول (1) التسلسل النكليوتيدي ودرجة الالتحام للبادئات المستخدمة.

الجدول (1): البادئات المستخدمة والتسلسل النكليوتيدي لكل منها ودرجة حرارة الالتحام الخاصة بكل بادئ

البادئ	التسلسل النكليوتيدي	درجة حرارة الالتحام °م /	عدد النكليوتيدات
Oligo1	GAGAGAGAGAGAGAGAT	61.09	17n
Oligo2	TCTCTCTCTCTCTCTCC	63.50	17n
Oligo3	ACACACACACACACACC	63.50	17n
Oligo4	CTCTCTCTCTCTCTCCT	63.50	17n
Oligo5	GACGACGACGACGAC	63.83	15n
Oligo6	GACAGACAGACAACA	55.63	15n

12n	38.92	CAACAACAACAA	Oligo7
18n	46.50	CACACACACACACACAAG	Oligo8
18n	46.50	GTGTGTGTGTGTGTTC	Oligo 9
18n	66.78	AGAGAGAGAGAGAGAGGC	Oligo 10
18n	46.50	CACACACACACACACAAG	Oligo11
17 n	61.09	GAGAGAGAGAGAGAGAT	Oligo12
17n	63.50	ACACACACACACACACC	Oligo 13
18n	46.50	GAGAGAGAGAGAGAGATC	Oligo 14
17n	61.09	TGTGTGTGTGTGTGTGA	Oligo 15

تفاعل البلمرة المتسلسل PCR:

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ضمن جهاز التدوير الحراري جهاز التدوير الحراري شركةEppendorf الشكل (4)، وفقاً لـ لـ(Williams *et al* .,1990) مع بعض التعديلات وكان حجم التفاعل النهائي 25ul باستخدام Master mix من شركة Vivantis الحاوي على (Buffer, $MgCl_2$)، ويوضح الجدول (2) مكونات تفاعل PCR.

الجدول (2) مكونات تفاعل PCR

مكونات ال PCR	الكميات والتراكيز
Buffer + MgCl	5 ul
dNTps	1 ul
DNA	2 ul
Taq	1 ul
Primer	2 ul
ddH_2o	14 ul

وتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري وفقاً للظروف التالية:

مرحلة الانفصال: فصل سلسلتي الـ DNA حيث يعمل برنامج التفاعل عند درجة حرارة 94°C درجة مئوية لمدة 5 دقائق، تتبع ب40 دورة تضمنت كل دورة المراحل التالية : التحطيم عند درجة حرارة 94 لمدة 45 ثانية، الالتحام وتتم حسب درجة الالتحام لكل بادئ من الجدول لمدة 45 ثانية، الاستطالة عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة.، وأخيراً اكتمال التفاعل عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، ثم حفظت العينات بدرجة حرارة -20 درجة مئوية.

الرحلان الكهربائي والتصوير:

فصل نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة الأغاروز ضمن محلول الرحلان واستخدام ايثيديوم بروماید لكشف حزم DNA ومعلم (Ladder DNA)(Pb100) ليشير لمواقع وحجم الحزم، الرحلان واستخدام الاشعة فوق البنفسجية لتظهير حزم الـ DNA ومقارنتها مع مؤشر الـ DNA القياسي، ثم تصوير وتوثيق الهلامة شركة BIORAD العالمية

(BioRad Gel Documentation Systems) حيث تم الترحيل على هلامة الأغاروز 1% لتحديد نجاح تقنية ISSR حيث حملت نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة الأغاروز و استخدم مؤشر من الحمض النووي Kpb DNA من شركة Vivantis لتحديد الحجم والوزن الجزيئي للحزم الناتجة، تم الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 90 فولت لمدة 45 دقيقة لفصل حزم الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم، وأخيراً تصوير الهلامة جهاز تصوير الهلامة شركة BIORAD العالمية (BioRad Gel Documentation Systems)، الشكل (5).

الشكل (5): جهاز تصوير الهلامة

- **التحليل الاحصائي:**

يتم إجراء التحليل الوراثي لتحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة بعد تحويل البيانات إلى صيغ رقمية بوجود الحزمة أو عدم وجودها، وأخذ بالحسبان الحزم الواضحة فقط، وإظهار النتائج على شكل شجرة قرابة وراثية.

تم تصميم التجارب المخبرية والمؤشرات المدروسة المذكورة سابقاً وتم تحليل البيانات إحصائياً وحساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري لكل معيار.

بالنسبة للدراسة الجزيئية، جُمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب قطع الـ DNA بين العينات المدروسة وأعطي الرقم (1) عند وجود حزمة الـ DNA والرقم (0) عند غياب وجود الحزمة، ونظمت الجداول لكل بادئة باستخدام برنامج Totallab ID، ورسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة Unweighted pair group Method with Arithmetic Averaging (UPGMA) باستخدام برنامج XLSTAT الاحصائي.

النتائج والمناقشة:

قيس تركيز DNA ونقاوته باستخدام جهاز قياس التراكيز النانوي، حيث تراوحت التراكيز بين (400 و750) ميكروغرام/ ميكروليتر وتراوحت نقاوة العينات بين (1.8-2).

وطبقت عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز بتركيز 1% للتأكد من نوعية الـ DNA، حيث ظهرت حزم الـ DNA على شكل حزم أو عصابات مضيئة ذات وزن جزيئي مرتفع وخالية من التقطعات والتكسر، ما يدل على أن الـ DNA ذو نوعية جيدة.

التعددية الشكلية الناتجة عن تطبيق تقانة ISSR:

تم اعتماد 11 بادئاً التي أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR الجدول (3)، وقد أثبتت هذه البادئات فعاليتها في التمييز بين النوعين المدروسين، ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه (41) بمتوسط (3.72) حزم، وتراوح عدد الحزم الكلية لكل بادئ بين (1) حزم كأقل عدد مع البادئ (Oligo 9) و(9) كأعلى عدد مع البادئ (Oligo12) بمتوسط (3.72) حزم وبلغ عدد الحزم المتعددة شكلياً (21) بمتوسط (1.9) حزمة، وتراوح عدد الحزم المتباينة شكلياً لكل بادئ بين (1) حزم كأقل عدد مع البادئ (Oligo 1, Oligo 5, Oligo 8, Oligo 9, Oligo 12, Oligo 13) و (4) حزم كأعلى عدد مع البادئ (Oligo 6).

الجدول (3) يوضح رموز البادئات المستخدمة، وعدد الحزم الكلية والمتباينة والنسبة المئوية للتعددية الشكلية 60.1% وكانت الأقل مع البادئة (Oligo 12) بمقدار (11.11%) وأعلاها مع البادئات (Oligo 3, Oligo 10, Oligo9, Oligo7, Oligo 6) أما بقية البادئات التي اعطت منتجات تضخيم في تفاعل PCR فقد أعطت نسبة مئوية للتعددية الشكلية بلغت (33.33%) للبادئات (Oligo 5, Oligo 1 Oligo 8,) ونسبة (50%) للبادئ (Oligo 11) وأخيراً بنسبة (20%) للبادئ (Oligo13).

الجدول (3): رموز البادئات المستخدمة، وعدد الحزم الكلية والمتباينة والنسبة المئوية للتعددية الشكلية

البادئات	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة	النسبة المئوية للتعددية الشكلية %
Oligo 1	3	1	33.33%
Oligo 3	3	3	100%
Oligo 5	3	1	33.33%
Oligo 6	4	4	100%
Oligo7	3	3	100%
Oligo 8	3	1	33.33%
Oligo 9	1	1	100%
Oligo 10	3	3	100%
Oligo 11	4	2	50%
Oligo 12	9	1	11.11%
Oligo 13	5	1	20%
المجموع	41	21	–
المتوسط	3.72	1.9	60.1%

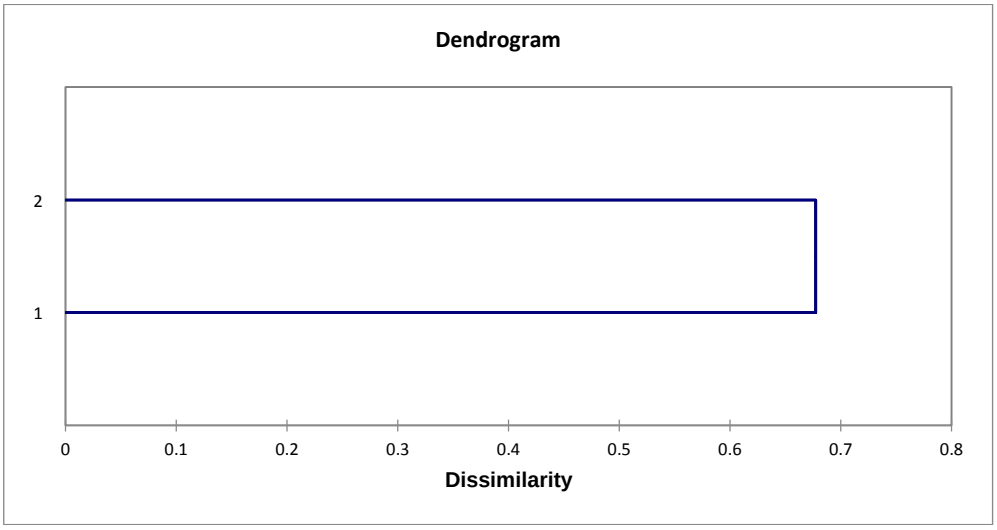
يلاحظ من الجدول أن معظم البادئات امتلكت القدرة على التمييز بين النوعين المدروسين.

التحليل العنقودي Cluster analiysis (شجرة القرابة):

يسمح التحليل العنقودي بتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بين الانواع المدروسة.

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لتحديد درجة القرابة الوراثية بين النوعين المدروسين، ويلاحظ من الشكل أن التباعد الوراثي بين النوعين المدروسين بلغ 67%، وإن هذه النسبة متوقعة وتدل على تباعد كبير بين النوعين المدروسين يُبَرَّر بأن النوعين ينتميان لفصيلتين مختلفتي الشكل (6).

وبسبب قلة الدراسات على الخفافيش ووجود عدد كبير من المرئسات (البادئات primers) الخاصة بتقانة ISSR فإنه من الصعب تحديد التوافق أو الاختلاف مع الدراسات الأخرى التي قد لاتعتمد تقنية ISSR أو لا تستخدم نفس البادئات، ومع ذلك فإن دراسة Prakarsa التي قام فيها بتشكيل شجرة القرابة بناء على توزع أنواع الخفافيش في أربعة كهوف فإن المجموعة المميزة احتوى فيها الكهف على نوعي خفافيش أكلة فاكهة بينما انضمت الكهوف الثلاثة التي تحوي خفافيش آكلة حشرات في عناقيد تتبع المجموعة الأخرى (**Popov, 2018**).



الشكل (6):التحليل العنقودي Cluster analiysis لنوعي الخفافيش المدروسين الناتج عن استخدام تقنية ISSR (1: النوع *Rousettus aegyptiacus*، 2: النوع *Pipistrellus kuhlii*).

References:

- Baishev, F. Z., Smirnov, D. G., & Vekhnik, V. P. (2014). Study of the genetic diversity of populations of Eptesicus nilssonii (Chiroptera: Vespertilionidae) wintering in artificial undergrounds of Samarskaya Luka. Samarskaya Luka: problems of regional and global ecology, 23(4), 86-95.
- Bornet, B.; Goraguer, F.; Joly, G. and Branchard, M. (2002). Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes (Solanum tuberosum subsp. tuberosum) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome 45: 481-484.
- Chowdhury, M.A.; Vandenberg, B. and Warkentin, T. (2002). Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (Cicer arietinum L.). Euphytica 127: 317–325.
- Eleuch, L., A. Jalil, S. Grando, S. Ceccarelli, M.K. Schmising, H. Tsujimoto, A. Hajer, A. Daaloul. and M. Baum. 2008. Genetic diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of barleygermoplasm using simple sequence repeat markers. J. Integ. Plant Biolo. 50(8):1005-1015.
- Kijas, J.M.H.; Fowler, J.C.S. and Thomas, M.R. (1995). An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. Genome 38:349–355.
- Popov, V. V. (2018). Bats in Bulgaria: Patterns of species distribution, richness, rarity, and vulnerability derived from distribution models. In *Bats*. IntechOpen.
- Rafalski, J.A.; Vogel, J.M.; Morgante, M.; Powell, W.; Andre, C. and Tingey, S.V. (1996). Generating and using DNA markers in plants. No mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide. 4:75-134.
- Ricciardi, L., V.Giorgio. C. De Giovanni. C. Lotti. A. Gallotta and G. Fanizza.(2002). The genetic of apulian apricot genotypes (Prunus armeniaca L.) assessed using AFLP markers. Cellular and Molecular Biology Letters.7:431-436.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullisand, K.B. and Eriich, H.A. (1988). Prime-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science .239:487-491.
- Wjhani, Y. (2004). Genetic studies on the biodiversity of local and wild Syrian wheat using modern biotechnological techniques (Doctoral dissertation).
- Williams, J.G.K; A.R.Kubelik; K.J. Livak; J.A. Rafalski and S.V. Tingey. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18(22) 6531-6535.
- WYNNE, J. W; Di Rubbo, A.; Shiell, B. J; Beddome, G; Cowled, C; Peck, G. R; Michalski, W. *Purification and characterisation of immunoglobulins from the Australian black flying fox (Pteropus alecto) using anti-fab affinity chromatography reveals the low abundance of IgA. PloS one*, 2013, 8.1: e52930.
- YAĞCI, T., & Baydemir, N. A. Genetic Divergence Patterns of Two Sibling Species (Myotis Myotis, Myotis blythii) and Myotis Cappacinii (Mammalia: chiroptera) in Cent
- ral Anatolia Region. Ecological Life Sciences, 14(4), 49-57.
ZHOU, P; Tachedjian, M; Wynne. J. W; Boyd. V; Cui, J, Smith; Mendenhall, I. H. *Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN-α in bats*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113.10: 2696-2701.