

مقایسه تنوع در توالی های ژنتیکی میتوکندریایی و هسته ای-ریبوزومی در گونه *Orius albidipennis* (Het:Anthocoridae) در مناطق مختلف ایران

مهدی دهقانی زاهدانی*

گروه گیاه پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

dehghanizahedani.mehdi@iau.ac.ir

چکیده

Orius albidipennis Reuter. در ایران یکی از گونه های مطرح در زمینه کنترل بیولوژیک آفات خصوصاً تریپس ها در شرایط گلخانه و مزرعه به شمار می رود. در این تحقیق حشرات کامل *O. albidipennis* طی سالهای ۱۳۹۸-۱۴۰۱ از ۱۲ منطقه مختلف ایران جمع آوری گردیدند. مناطق نمونه برداری عبارت بودند از: تهران، گرگان، مشهد، زابل، کرمان، یزد، اصفهان، شیراز، بندرعباس، رودان، شهرکرد و همدان. توالی های نوکلئوتید ژن هسته ای ریبوزومی ITS1 و COI بین جمعیت های *O. albidipennis* مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در توالی های COI در جمعیت های *O. albidipennis* مشاهده نگردید در حالی که این تفاوت ها در ITS1 بسیار مشهود بود. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فیلوژنی در جمعیت ها و افراد نشان داد که جمعیت های بندرعباس و رودان دارای بیشترین اختلاف ژنتیک نسبت به سایرین می باشند. در نهایت مشخص گردید که میزان تنوع ژنتیک بین افراد در گونه *O. albidipennis* نسبتاً زیاد بوده و توالی ITS1 می تواند به عنوان یک معیار مناسب جهت تشخیص تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت های *O. albidipennis* مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *Orius albidipennis*، ITS1، COI، فیلوژنی، کنترل بیولوژیک.

مقدمه

بررسی موجودات زنده بر مبنای علم سیستماتیک اولین قدم در شناخت و کاربرد آنها در علوم مختلف خواهد بود. در طول سالیان داده های مرفولوژیک همواره به عنوان منبع اصلی اطلاعات برای پی بردن به ارتباطات فیلوژنتیک بین گونه ها و جمعیت ها معرفی می شدند تا این که . با کشف واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) ماده وراثتی یا DNA نیز به عنوان نیکی از منابع اصلی مطالعات فیلوژنتیک و تفکیک گونه ها مطرح گردید. استفاده از روشهای ترکیبی مرفولوژیک و مولکولی موسوم به CAMM در سالهای اخیر بین محققین مرسوم گردیده و با توجه به نتایج بدست آمده ، عدم تطابق نتایج مرفولوژیک و مولکولی در بسیاری از تحقیقات باعث ایجاد نظریه های جدیدی بین متخصصین علم بیوسیستماتیک گردیده و در بعضی موارد کارایی روش های مرفولوژیک به چالش کشیده شده است (Scotland et al., 2005; Weeler, 2008).

تمام روشهای مولکولی تولید داده هایی می نمایند که می توان آنها را بصورت عددی (Digital) نمایش داد . استفاده از این روش ها می تواند به دو صورت فاصله مدار و یا خصوصیت مدار مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد . در این پژوهش در ارتباط از توالی های میتوکندریایی از COI و از توالی های هسته ای ریبوزومی، توالی های ITS1 مورد استفاده قرار گرفتند.

بر اساس مطالعات Caterino و همکاران (۲۰۰۰) ژن های میتوکندریایی با ارزش ترین نشانگر را در شناخت و تمایز سطوح مختلف گونه ها تولید می نمایند که معمولاً توالی COI مهمترین توالی ژنی میتوکندریایی بوده و در این راستا مورد استفاده قرار می گیرد. ژن COI دارای ۶۵۰ جفت باز بوده و بیشتر به عنوان یک شاخص در فرایند های DNA Barcoding به کار گرفته می شود (Rubinoff and Holland, 2005). Avis (1994) بیان می دارد که ژن های میتوکندریایی خصوصاً COI می تواند به عنوان یک گزینه مناسب در تشخیص گونه ها و تعیین رابطه تکاملی گونه ها مورد استفاده قرار گیرد.

استفاده از ژن های میتوکندریایی در بررسی تنوع ژنتیک بین جمعیت های گونه های حشرات بارها مورد بررسی قرار گرفته است. Macron و همکاران (۱۹۹۹) تنوع ژنتیک در جمعیت های *Ostrina nubilalis* را با استفاده از COI مورد بررسی قرار دادند. همچنین Szalanski و همکاران (۱۹۹۶) تنوع ژنتیک مگس اصطلب *Stomyx calcitrans* را در ایالات متحده با استفاده از ژن COI مورد بررسی قرار دادند .

ژن های هسته ای ریبوزومی بطور گسترده در مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرند . این ژن ها شامل سه ژن مختلف (28S rDNA, 18S rDNA, 5.8S rDNA) می باشند که به RNA ترجمه می شوند (ارده ، ۱۳۸۷). در میان این ها ۲ قسمت ITS1, ITS2 وجود دارند که در انتقال اطلاعات ژنتیک نقش نداشته و تحولات و تغییرات در آنها با سرعت انجام می گیرد ، از این رو این ژن ها برای جداسازی و متمایز کردن گونه های نزدیک به هم بسیار مفید هستند (Whiting, 2002). به طور کلی ژن های هسته ای ریبوزومی یا rDNA برای مطالعات بین جمعیت ها و درون جمعیت های یک گونه خاص بسیار مناسبند . دلیل این امر آنست که میزان تغییرات را سریع نشان می دهد (Porter and Collinz, 1991). البته این ژن ها معمولاً با آغازگرهای عمومی تکثیر نشده و در برخی گونه های این قطعات یکنواخت نیستند اما تفاوت بین افراد در جمعیت ها را به بهترین شکل ممکن نشان می دهند (Williams et al., 1985). ژن های هسته ای- ریبوزومی به مانند ژن های میتوکندریایی به دلیل سرعت کم در بروز تغییرات، بیشتر برای تشخیص روابط تکاملی بین تاکسون های حشرات خصوصاً در سطوح جنس و خانواده مورد استفاده قرار می گیرند (Paun and Grigg, 2024).

مطالعات Li و همکاران (۲۰۲۱) نشان می دهد که توالی های هسته ای-ریبوزومی به خصوص ITS2 می تواند به عنوان

یک کلید تاکسونومی در طبقه بندی گونه *Anastrepha fraterculus* مورد استفاده قرار گیرد. Fritz و همکاران (۱۹۹۴) تنوع ژنتیک جمعیت های پشه *Anopheles nuneztovari* را در چند کشور آمریکای جنوبی بوسیله ژن های ITS2 و ITS1 مورد بررسی قرار دادند. همچنین ارده و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از ژن های ITS2 و ITS1 وجود تفاوت های بین جمعیتی و درون جمعیتی را در دو گونه زنبور پارازیته *Eretmocerus eremicus* و *E. mundus* تشخیص دادند. در خصوص گونه های جنس *Orius* نیز Honda و همکاران (۲۰۰۵) ۱۰ گونه متعلق به جنس *Orius* را تفکیک نموده و نشان داد که کلیدهای مرفولوژیک تا حدی می توانند با داده های مولکولی منطبق شوند اما در برخی موارد تفاوت دیده شد. Muraji و همکاران (۲۰۰۰) تفاوت ژنتیکی در ۷ گونه متعلق به خانواده Anthocoridae را بوسیله ژن COI و 16S مورد بررسی قرار دادند. با افزایش سطوح تاکسونومیک میزان تنوع ژنتیک به صورت خطی صعود کرد. نتایج این محققین نشان داد که توالی های نوکلئوتید در دو ژن مورد مطالعه برای تشخیص ارتباط میان گونه ای یا به عبارت دیگر در سطوح پایین تاکسونومیک (سطوح گونه و جمعیت) مناسب است.

هدف اصلی از این پژوهش بررسی کارایی توالی های میتوکندریایی و هسته ای-ریبوزومی در تفکیک جمعیت های گونه *O.albidipennis* در مناطق مختلف ایران می باشد. و در نهایت رسیدن به این رهیافت که کدام توالی اختلاف بیشتری را در نمونه ها نشان می دهد و می تواند به عنوان یک شاخص در تفکیک و تمایز افراد گونه *O.albidipennis* در مناطق مختلف ایران موثر واقع شود.

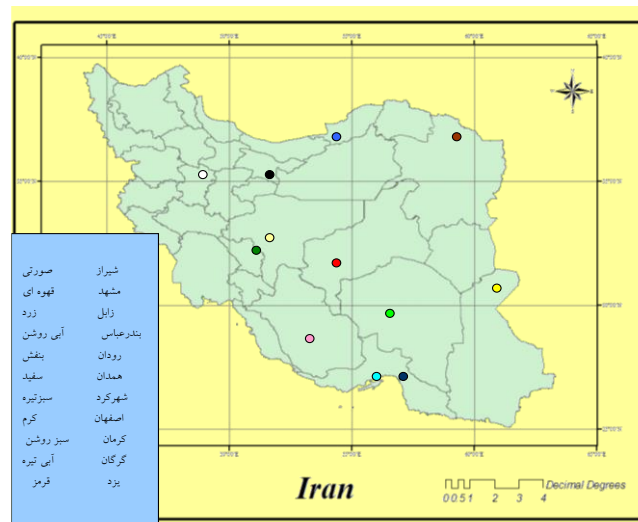
سنگهای جنس *Orius* از دشمنان طبیعی شکارگر آفات مکنده نظیر تریپس ها، پسیل ها، سفید بالک ها، شته ها، کنه ها و تخم حشرات بوده و در اکوسیستمهای زراعی نقش مهمی در کنترل آفات گیاهی ایفا می کنند (شجاعی، ۱۳۷۹، Pericard, 1972).

Orius albidipennis Reuter. مربوط به زیر جنس *Dimorphella* بوده که بر اساس مطالعات استوان و نیاکان (۱۳۷۸) تنها گونه موجود در زیر جنس مذکور در ایران می باشد. بررسی مقدماتی بیولوژی *O. albidipennis* در ایران بوسیله استوان و میرهلی در سال ۲۰۰۵ میلادی انجام گرفت. تحقیقات این دو نشان داد که گونه *O. albidipennis* دارای ترجیح میزبانی نسبت به تریپس ها بوده و بیشتر از تریپس پیاز *Thrips tabaci* Lind. در شرایط گلخانه و مزرعه تغذیه می نماید. به دلیل آن که سنگ *O. albidipennis* در شرایط دمای ثابت وارد مرحله دیپوز نمی شود، لذا این سنگ می تواند در کنترل تریپس پیاز در شرایط گلخانه بسیار مؤثر واقع شود (Ostovan and Mirheli, 2005).

تحقیقات نشان داده که مطالعات مرفولوژیک بر اساس خصوصیات فنوتیپی در گونه های جنس *Orius* بسیار مشکل بوده به نمونه های فراوانی نیاز دارد. دلیل این امر وجود شباهتهای زیاد از لحاظ رنگ و شکل بین افراد یک گونه و گونه های جنس مزبور با یکدیگر بوده و برای درک این تفاوتها نمونه های فراوانی باید جمع آوری گردد (Yasunaga, 1997). از این رو استفاده از روشهای مولکولی در تشخیص و تفکیک گونه ها و جمعیت های این جنس از اهمیت به سزایی برخوردار است.

مواد و روش ها

با توجه به اهمیت و وفور گونه *O.albidipennis* در منطقه خاورمیانه، نمونه برداری از سنگ های مزبور از نقاط مختلف ایران انجام گرفت. در این نمونه برداری اهتمام به شرایط اقلیمی و جغرافیایی متفاوت در ایران مورد توجه قرار گرفته و عامل اصلی در انتخاب محل نمونه برداری در نواحی اقلیمی ایران بود (شکل ۱)



شکل ۱: مناطق ۱۲ گانه نمونه برداری سنکهای *O. albidipennis* در ایران

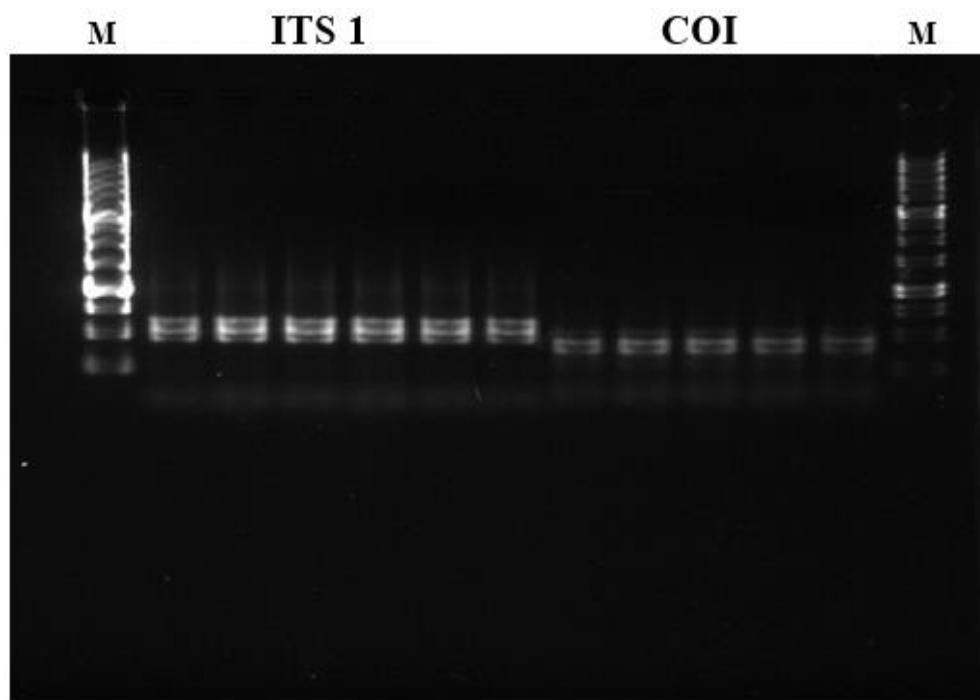
نکته مهمی که در روش های نمونه برداری بدان توجه گردید، توجه به این مسأله بود که سنک های *Orius* حتی الامکان از روی گیاهان وحشی بومی و در فضاهای غیر شهری جمع آوری گردند. به طور کلی انتخاب گونه های گیاهی وحشی و بومی (Indigenous) می تواند دید بهتری را از وضعیت اقلیمی و جغرافیایی در منطقه مورد مطالعه در اختیار ما قرار دهد. (Tommasini, 2004).

طی سال های ۱۳۹۵-۱۳۹۸ از سنک های *O. albidipennis* واقع در ۱۲ منطقه مختلف ایران نمونه برداری شد. بر این اساس مناطقی در گرگان، مشهد، تهران، همدان، اصفهان، کرمان، شهرکرد، شیراز، بندرعباس، رودان، زابل و یزد انتخاب گردید و در طی سه سال از روی گیاهان مختلف، سنک های Anthocoridae جمع آوری شدند. روش نمونه برداری از سنک های Anthocoridae بر اساس روش استوان و نیاکان (۱۳۷۸) و (Tommasini, 2004) انجام پذیرفت. با توجه به فعالیت سنک های Anthocoridae در ساعات آفتابی، نمونه برداری از گیاهان از ساعت ۹ صبح آغاز گردیده و حدوداً تا ساعت ۱۶ ادامه یافت. بر اساس مطالعات (Tommasini, 2004) و Honda و همکاران (۱۹۹۸) اوایل ماه آوریل تا اوایل اکتبر (مصادف با اواسط فروردین تا اواسط مهر ماه) بهترین زمان نمونه برداری از سنک های Anthocoridae روی گیاهان بوده که البته در مناطق گرمسیری مانند بندرعباس و رودان این نمونه برداری تقریباً در تمام ایام سال انجام پذیرفت. پس از آن نمونه ها در اتیل الکل ۹۶ درجه به منظور استخراج DNA قرار داده شدند. برای بررسی تنوع ژنتیک *O. albidipennis* بین جمعیت ها و درون جمعیت ها، ۱۲ جمعیت *O. albidipennis* انتخاب گردیده و برای آگاهی از تنوع ژنتیک درون جمعیت ۴ فرد حشره از هر ۱۲ جمعیت انتخاب شده (مجموع ۴۸ فرد حشره) و ماده وراثتی یا DNA آن ها با روش های معمول استخراج گردید. بدین منظور هر فرد حشره از شیشه حاوی الکل با قلم موی نازک خارج گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یک شیشه ساعت قرار داده شد. این عمل به منظور تبخیر الکل موجود روی بدن حشره انجام گرفت. به طور کلی در فرآیند استخراج DNA الکل به عنوان یک مانع جدی محسوب شده و از استخراج بهینه DNA جلوگیری می نماید. استخراج DNA از سنک های *O. albidipennis* به وسیله کیت Bio-Rad انجام پذیرفت.

پس از حصول اطمینان از تکثیر مطلوب DNA در چرخه ی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، میکروتیوپ های حاوی محصول PCR با پارافیلیم بسته بندی و کدگذاری شده، همچنین عملیات خالص سازی (Purification) برای کاهش آلودگی های احتمالی بر روی آن ها انجام گردید. سپس نمونه ها برای تعیین توالی (Sequencing) به کشور آلمان ارسال گردیدند.

پس از عملیات تعیین توالی، برای سنجش دقت آزمایش و تطابق توالی نمونه های *O.albidipennis*، توالی ها به بانک ژن NCBI از طریق سایت <http://www.NCBI.nil.gov> فرستاده شد و وجود این تطابق مشخص گردید. پس از اطمینان حاصل نمودن از صحت و دقت توالی ها با مقایسه آنها با توالی های موجود در NCBI، توالی ها یک بار به صورت دستی (Manual) و یک بار نیز توسط نرم افزارهای رایانه ای MUSCLE 3.7 و G.blocks 0.91b ترازبندی گردیدند. تجزیه و تحلیل فیلوژنی و ترسیم درخت توسط نرم افزارهای PhyML 3.0 و OLRT طراحی شده توسط Guindon and Gascuel (2003) و Tree Dyn 198.3 طراحی شده توسط (Chevent et al., 2006) اجرا گردید. جهت تجزیه و تحلیل فیلوژنی از دو روش فاصله مدار و خصوصیت مدار استفاده شد. برای تشخیص تنوع ژنتیک بین جمعیتها و درون جمعیتها در گونه *O.albidipennis* از دو نرم افزار XLSTAT 2009 و Arlequin 3.0 استفاده شد. با استفاده از نرم افزار Arlequin 3.0 شاخص هایی نظیر نقاط پلی مرفیک، تعداد اللها و میزان ناجور تخمی مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین تنوع ژنتیک درون جمعیتها، و از شاخص های FST شرح داده شده بوسیله (Weir and Cockerham (1984) و آزمون AMOVA برای محاسبه تنوع ژنتیک بین جمعیتها و تعیین درصد میزان اختلاف درون جمعیتها و بین جمعیتها استفاده گردید.

نتایج و بحث



شکل ۱: مقایسه توالی های ITS1 و COI در نمونه های *O.albidipennis*

نتایج حاصل از استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در نمونه های *O.albidipennis* نشان از تکثیر موفق DNA در ITS1 و COI داشت (شکل ۱).

آنچه از نتایج حاصل از آزمون LSD، AMOVA و روش مقایسه دو به دو (Pairwise calculation) و نتایج فیلوژنی مشخص می شود این است که در جمعیتهای *O. albidipennis* علیرغم وجود شباهت های مرفولوژیک از نظر ژنتیک

تفاوت وجود دارد.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فیلوژنی نشان داد که تفکیک نمونه ها و جمعیتها در توالی های ITS1 به خوبی مشاهده گردید در حالی که در COI ما شاهد چنین تفاوتی نبودیم. لذا این نتایج نشان داد که در روش تعیین توالی مستقیم، توالی های ITS1 معیار مناسب تری در مقایسه با COI بودند. نتایج سایر تحقیقات در خصوص مقایسه توالی های ITS و COI نتایج متفاوت و به عبارت ساده تر ضد و نقیضی را نشان می دهد.

نتایج Oueslati و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که توالی های ITS و COI در جمعیت های پسیل زیتون تفاوت چندانی را نشان نمی دهد و شاید تک خواری محدود (Monophagy) این حشره دلیلی بر عدم تنوع در توای های میتوکندریایی و هسته ای-ریبوزومی آن باشد.

Sperling (2003) معتقد است که توالی های ژنی COI در تشخیص گونه های بسیار نزدیک از لحاظ مرفولوژیک و همچنین تفکیک جمعیت های یک گونه ژن مناسبی نبوده و بهتر است از ژن های هسته ای ریبوزومی نظیر ITS در تفکیک جمعیت های مختلف در گونه های حشرات استفاده نمود. همچنین داده های استخراج شده در تحقیقات Erney و همکاران (۱۹۹۶) بر روی سرخرطومی یونجه نشان داد که توالی های COI در جمعیت این حشره تغییرات چندانی را نمایش نمی دهند. Szalanski و همکاران (۱۹۹۹) دلیل این عدم تفاوت را در توان جابجایی یا مهاجرت بالای گونه های حشرات می دانند. البته به نظر می رسد عدم تغییر معنی دار در توالی های نوکلئوتید در میتوکندری دلیل اصلی این عدم تغییر باشد. ضمن آن که بر اساس نتایج نگارنده این تغییر در توالی های هسته ای-ریبوزومی به خصوص ITS و 18S به خوبی قابل مشاهده است. لذا به نظر می رسد رفتارهایی نظیر مهاجرت یا جریان ژنی دلیلی بر عدم تغییر در توالی های COI نیست. توالی های نوکلئوتید ITS 1 که در تجزیه و تحلیل فیلوژنی، آزمون LSD و PCA در جمعیتهای *O. albidipennis* مورد بررسی قرار گرفت نشان داد جمعیتهای بندرعباس و رودان و در درجه دوم همدان و شهرکرد با سایر جمعیتها به طور معنی داری متفاوت می باشند (شکل ۲).



شکل ۲: درخت حاصل از تجزیه و تحلیل فیلوژنی به روش Maximum-Likelihood بر اساس مدل جایگزینی GTR

چنین تفاوت ژنتیکی در ژن ITS در مطالعات Fritz, et al. (1994) بر روی پشه های آنوفل *Anopheles nuneztuvayi* نیز مشاهده گردید.

طول قطعه توالی های نوکلئوتید در سنکهای *O. albidipennis* متفاوت بوده که وقوع چنین حالتی در ژن های هسته ای ریبوزومی عمومیت دارد (Porter and Collinz, 1991). همچنین بر اساس نتایج (Muraji, et al. (2000، در سنکهای جنس *Orius* نرخ جانمایی نوکلئوتیدها بسیار بالا بوده و این نتیجه در جمعیت های سنک *O. albidipennis* نیز به وضوح مشاهده گردید.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فیلوژنی توالی های ITS 1 در جمعیت‌های *O. albidipennis* به روش Maximum Likelihood و Neighbor Joining نشان داد که توالی های نوکلئوتید در یکی از افراد جمعیت بندرعباس (Bandarabas 3) با بقیه بسیار متفاوت بوده و یکی از افراد جمعیت‌های شیراز و گرگان (Shiraz 4, Gorgan 4) نیز دارای توالی های متفاوتی نسبت به سایر افراد جمعیت خود بودند (شکل ۲). Fritz, et al. (1994) نیز وجود افرادی را که از نظر توالی نوکلئوتید با جمعیت اصلی خود متفاوت بوده و جدا از جمعیت‌های خود و یا نزدیک به جمعیت‌های دیگر قرار می گیرند را تأیید می نمایند. در تحقیق ایشان ۲ فرد مربوط به منطقه پاراگوئه کورا در برزیل از نظر توالی نوکلئوتید از افراد جمعیت خود فاصله گرفته و نزدیک به جمعیت‌های سورینام قرار گرفتند. در جمعیت‌های *O. albidipennis* نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فیلوژنی، به روش ML نشان میدهد که یکی از افراد جمعیت شیراز (Shiraz 4) از جمعیت خود فاصله گرفته و به جمعیت



اصفهان نزدیک شده است (شکل ۲). بروز چنین تفاوتی در افراد یک جمعیت با سایر افراد تا حد زیادی قابل توجیه است زیرا که همواره بروز تغییرات ژنتیکی ابتدا در افراد یک جمعیت شکل می گیرد (Huxley, 1995; Luck, et al. 2003; Weiner, 1942). Ohta and Dover (1984) در حالتی موشکافانه تر وقوع چنین پدیده ای را اینگونه توجیه می نمایند: فرایندهای تغییر ژن، تبادلات نامساوی و جابجایی ژن ها، و تثبیت یک نسخه از جهش بدون نیاز به یک دگرگونی بزرگ شکل می گیرد و عبارت دیگر لزومی ندارد که تغییرات در کل افراد جمعیت نمود پیدا کند. بروز تغییرات کوچک در توالی های نوکلئوتید ممکن است در یک فرد به وجود آمده و به این مسأله بستگی دارد که کدام کروموزوم در هر نسل توزیع می شود. در هر حال این تغییرات کوچک به عواملی نظیر سیستم جفت گیری، مهاجرت و انتخاب طبیعی بستگی دارد (Ohta and Dover, 1984; Williams, 1990).

منابع

۱. استوان، ه. نیاکان، ج. (۱۳۷۸) معرفی برخی از گونه های سنک های زیرخانواده Anthocorinae در استان فارس. مجله علمی پژوهشی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۵(۲۰)، ۵-۱۴.
2. Ardeh, M. J., De Jong, P. W. & Van Lenteren, J. C. (2005) Intra and Inter specific host discrimination in arrhentokous and thelytokous *Eretmocerus* spp. *Biological Control* 33, 74-80.
3. Avise, J. C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall NY. 511 pp.
4. Caterino, M. S., Cho, S. & Sperling, F. A. H. (2000) The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 2000, 1-54.
5. Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A.L., Jacq, B. & Christen, R. (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics & annotations for trees analyses. Available on: <http://www.treedyn.org>.
6. Erney, S.J., Pruess, K.P., Danielson, S.D. and Powers, T.O. (1996) Molecular differentiation of alfalfa weevil strains (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of Entomological Society of America*. 89: 804-811.
7. Fritz, G. N., Conn, J., Cockburn, A. & Seawright, J. (1994) Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer 2 from Populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Molecular Biology and Evolution*. 11(3), 406-416.
8. Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5), 696-704.



9. Honda, J., Nakashima, Y., Yanase, T., Kawarabata T. & Hirose, Y. (1998) Use of the internal transcribed spacer (ITS-1) region to infer *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae) species phylogeny. *Applied Entomology and Zoology*. 33(4), 567-571.
10. Huxley, J. (1942) *Evolution: The Modern Synthesis*. Allen & Unwin, London, UK.
11. Luck, G. W., Daily, G. C. & Ehrlich, P. R. (2003) Population diversity and ecosystem services. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 331-336.
12. Marcon, P. C. R. G., Taylor, D. B., Mason, C. E., Hellmich, R. L. & Siegfried, B. D. (1999) Genetic similarity among pheromone and voltinism races of *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Molecular Biology* 8, 213-222.
13. Muraji, M., Kawasaki, K. & Shimizu, T. (2000) Nucleotide sequence variation and phylogenetic utility of the mitochondrial COI fragment in anthocorid bugs (Hemiptera: Anthocoridae). *Applied Entomology and Zoology* 35(3), 301-307.
14. Muraji, M., Kawasaki, K., Shimizu, T. & Noda, T. (2004) Discrimination among Japanese Species of the *Orius* Flower Bugs (Heteroptera: Anthocoridae) Based on PCR-RFLP of the Nuclear and Mitochondrial DNAs. *Japan Agricultural Research Quarterly* 38(2), 91-95.
15. Ohta, T. & Dover, G. A. (1984) The cohesive population genetics of molecular drive. *Genetics* 108, 501-521.
16. Ostovan, H. & Mirhelli, A. (2005) Flower bugs of the genus *Orius* Wolff (Heteroptera: Anthocoridae) from Iran and feeding rate of predatory bug *Orius albidipennis* (Reuter) under laboratory conditions. *Integrated Control in Protected Crops. Temperate Climate IOBC/wprs Bulletin* 28(1), 195-196.
17. Porter, C. H. & Collinz, F. H. (1991) Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45, 271-279.
18. Paun, A. and Grigg, M.E. (2024) Rapid detection, quantification and speciation of *Leishmania* using real-time PCR and DNA sequencing at the rRNA Internal Transcribed Spacer 2. *bioRxiv*.
19. Oueslati, N., Ghedir, A., Choulak, S., Gasmi, L., Said, K. and Ometto, L. (2024) An initial investigation into the genetic diversity, phylogenetic relationships, and population structure of the Olive Psyllid *Euphyllura olivina* in Tunisia. *Phytoparasitica*, 52(5), p.89.
20. Rubinoff, D. & Holland, B. S. (2005) Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Systematic Biology* 54, 952-961.



21. Scotland, R. W., Olm, R. G. & Bennett, J. R. (2003) Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Systematic Biology* 52(4), 539-548.
22. Sperling, F. A. H. (2003) Butterfly molecular systematics: from species definitions to higher-level phylogenies. pp. 431-458 in Boggs, C., Ehrlich, P. & Watt, W. (Ed.) *Ecology and Evolution Taking Flight: Butterflies as Model Study Systems*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
23. Szalanski, A.L., Taylor, D. B. & Peterson, R. D. I. I. (1996) Population genetics of stable fly (Diptera: Muscidae) in Nebraska, *Journal of Medical Entomology* 33, 413-420.
24. Szalanski, A. L., Roehrdanz, R. L., Taylor, D. B. & Chandler, L. (1999) Genetic variation in geographical populations of western and Mexican corn rootworm. *Insect Molecular Biology* 8(4), 519-525.
25. Tommasini, M. G., (2004) Collection of *Orius* species in Italy, *Bulletin of Insectology* 57 (2), 65-72.
26. Weiner, J. (1995) *The Beak of the Finch: Evolution in Real Time*. Vintage Books, London, UK.
27. Weir, B. S. & Cockerham, C. C. (1984). Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358–1370.
28. Wheeler, Q. D. (2008) Undisciplined thinking: morphology and Hennig unfinished revolution. *Systematic Entomology* 33, 2-7.
29. Whiting, M. F. (2002) Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. *Zoologica Scripta* 31, 3-15.
30. Williams, S. M., De Salle, R. & Strobeck C. (1985) Homogenization of geographical variants at the nontranscribed spacer of rDNA in *Drosophila mercatorum*. *Molecular biology and Evolution* 2, 338-346.