

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Korana A. Kocić

Molekularna filogenija, subgenerička  
klasifikacija i kriptička specijacija evropskih  
vrsta roda *Ephedrus* Haliday (Hymenoptera,  
Braconidae, Aphidiinae)

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Korana A. Kocić

Molecular phylogeny, subgeneric  
classification and cryptic speciation of the  
European species of genus *Ephedrus*  
Haliday (Hymenoptera, Braconidae,  
Aphidiinae)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

**Mentor:**

**Dr Željko Tomanović**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu,

Biološki fakultet

---

**Mentor:**

**Dr Anđeljko Petrović**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu,

Biološki fakultet

---

**Član komisije:**

**Dr Milana Mitrović**, naučni savetnik

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

---

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

*Najveću zahvalnost dugujem svojim mentorima dr Željku Tomanoviću i dr Anđeljku Petroviću na ukazanom poverenju i prilici koja mi je omogućila da upoznam svet parazitskih osa i budem deo odličnog tima. Hvala im na velikoj podršci i prenesenom znanju, kao i na aktivnom učestvovanju u svim delovima izrade disertacije. Takođe, zahvaljujem im se puno i na strpljenju, koje mi je u određenim momentima puno značilo.*

*Naučnom savetniku dr Milani Mitrović sa Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu zahvaljujem se na pomoći tokom laboratorijskog rada, kao i na svim sugestijama tokom pisanja rada i teze, koje su u velikoj meri doprinele poboljšanju kvaliteta teksta.*

*Ovom prilikom bih se zahvalila dr Oliveri Petrović–Obradović, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, na pomoći oko identifikacije biljnih vaši.*

*Želim posebno da se zahvalim i kolegici Jelisaveti Črkić na prijateljstvu i nesebičnoj pomoći u svim fazama istraživanja i pisanja.*

*Hvala i mojim dragim kolegama Katarini Stojanović, Nikoli Vesoviću i Milenki Božanić na prijateljstvu i raznim oblicima pomoći tokom izrade disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i svim kolegama sa Katedre za zoologiju beskičmenjaka i entomologiju, kao i ostalim kolegama sa Instituta za zoologiju.*

*Zahvaljujem se i kolegama iz Niša, dr Vladimiru Žikiću i dr Saši Stankoviću na pomoći pri sakupljanju materijala i korisnim savetima o parazitskim osama.*

*Deo materijala koji je upotrebljen prilikom izrade ove studije su obezbedili: dr Vladimir Žikić (Prirodno–matematički Fakultet, Univerzitet u Nišu), Finski prirodnjački muzej (Helsinki), Elena Davidian (Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, Russia) i Petr Starý (Laboratory of Aphidology, Institute of Entomology, Academy of Sciences of the Czech Republic) i ovom prilikom im se zahvaljujem.*

*Na kraju, zahvaljujem se svojoj porodici, koja mi je pomagala tokom celog školovanja i omogućila da stignem do ove tačke u mom životu. Neizmerno vam hvala.*

*Autor*

# Molekularna filogenija, subgenerička klasifikacija i kriptička specijacija evropskih vrsta roda *Ephedrus* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)

## Rezime

Rod *Ephedrus* Haliday, 1833 (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) jedan je od brojnijih rodova unutar potfamilije Aphidiinae, sa više od 40 opisanih vrsta širom sveta, od kojih je 18 zabeleženo u Evropi. Kao i ostali članovi potfamilije Aphidiinae, vrste ovog roda predstavljaju primarne parazitoide biljnih vaši. Iz tog razloga, vrste roda *Ephedrus* mogu imati značajnu ulogu u biološkoj kontroli. Rod se smatra bazalnim unutar potfamilije Aphidiinae, na osnovu pleziomorfnih morfoloških karaktera, nekoliko molekularnih analiza na nivou potfamilije i dve fosilne vrste.

I pored činjenice da su pojedine vrste roda *Ephedrus* bile uključene u molekularne analize na nivou potfamilije Aphidiinae i familije Braconidae, do danas ne postoji molekularna studija koja se bavila isključivo ovim rodom.

U cilju rasvetljavanja filogenetskih odnosa i taksonomskog statusa podrodova i vrsta roda *Ephedrus*, korišćen je integrativno taksonomski pristup, kombinacija molekularnih markera i morfometrije. Odabrani molekularni markeri koji su se pokazali pouzdanim u prethodnim studijama potfamilije Aphidiinae bili su barkoding citohrom *c* oksidaza subjedinica I (COI) i jedarni faktor elongacije (EF1 $\alpha$ ). Analizirane jedinke su sakupljene u poslednje dve decenije, na teritoriji većeg broja evropskih zemalja. U ovoj studiji ukupno 15 evropskih vrsta roda *Ephedrus* je analizirano. Rezultati molekularne i morfološke analize nisu podržale tradicionalnu klasifikaciju vrsta u tri opisana podroda (*Breviephedrus*, *Ephedrus* i *Lysephedrus*). Vrste su se razdvojile u tri klade sa najvišim genetičkim distancama zabeleženim na subgeneričkom nivou potfamilije Aphidiinae. Vrsta *E. brevis* se odvojila od *persicae* i *plagiator* grupe vrsta sa genetičkim distancama 19,6 % i 16,3 %, dok je prosečna genetička distanca između *persicae* i *plagiator* grupa vrsta

iznosila 20,7%. Rezultati ove studije su doveli do zaključka da je neophodna revizija subgeneričke klasifikacije roda *Ephedrus*, pa se iz tog razloga predlaže nova. Podrod *Lysephedrus* Starý se klasifikuje kao mlađi sinonim podroda *Ephedrus*, iz kog se *persicae* grupa vrsta podiže na nivo podroda *Fovephedrus* Chen. Podrodovi *Fovephedrus* i *Ephedrus* su ponovo opisani. Opisane su dve vrste nove za nauku, *Ephedrus hyadaphidis* Kocić & Tomanović sp. n. i *Ephedrus tamaricis* Tomanović & Petrović sp n., a dve vrste su sinonimizirane: vrsta *E. dysaphidis* syn. n. kao mlađi sinonim vrste *E. cerasicola* i vrsta *E. blatnyi* syn. n. kao mlađi sinonim vrste *E. plagiator*. Takođe, status većeg broja vrsta je po prvi put potvrđen i molekularnim metodama.

Ključne reči: *Ephedrus*, *Breviephedrus*, *Fovephedrus*, COI, EFa, molekularna filogenija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Morfologija, sistematika i filogenija životinja

## Molecular phylogeny, subgeneric classification and cryptic speciation of the European species of genus *Ephedrus* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)

### Summary

Genus *Ephedrus* Haliday, 1833 (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) is represented with more than 40 species worldwide from which 18 are distributed in Europe. As all members of the subfamily Aphidiinae, species from this genus are primary parasitoids of aphids. Because of that, *Ephedrus* species have a role in biological control. It is generally considered that the genus has basal position within subfamily Aphidiinae, due to plesiomorphic morphological characters, several molecular studies and two fossil species findings.

Besides the fact that the several species of the *Ephedrus* genus were included in molecular analysis on the family or subfamily level, there is no study that dealt with the

molecular analysis of this genus. In order to resolve the phylogenetic relationships among subgenera and species of genus *Ephedrus*, the combination of molecular methods and morphometry was used. The molecular markers cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) and nuclear elongation factor (EF1 $\alpha$ ) were used. These markers proved to be reliable in previous studies of Aphidiinae subfamily. Fifteen out of eighteen currently known species were analyzed, representing three subgenera: *Breviephedrus* Gärdenfors, 1986, *Lysephedrus* Stary, 1958 and *Ephedrus* Haliday, 1833. The results of molecular and morphological studies did not support this classification. Three clades separated with the highest genetic distances reported for subfamily Aphidiinae. *Ephedrus brevis* separated from *persicae* and *plagiator* species groups with the genetic distances of 19.6% and 16.3% respectively, while the distance between *persicae* and *plagiator* groups was 20.7%. This result led to the conclusion that the traditional subgeneric classification of *Ephedrus* needs revision. *Lysephedrus* is assigned as a junior synonym of subgenus *Ephedrus*, from which *persicae* species group is raised to subgenus level as redescribed subgenus *Fovephedrus* Chen, 1986. Two species new to science are described *Ephedrus hyadaphidis* Kocić & Tomanović sp.n. and *Ephedrus tamaricis* Tomanović & Petrović sp. n.. Furthermore, two species are synonymised: *E. dysaphidis* as a junior synonym of *E. cerasicola* and *E. blatnyi* as a junior synonym of *E. plagiator*. Several species are confirmed as valid species for the first time.

Key words: *Ephedrus*, *Breviephedrus*, *Fovephedrus*, COI, EF $\alpha$ , molekularna filogenija

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Morphology, systematics and phylogeny of animals

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 BIOLOGIJA PARAZITOIDA POTFAMILIJE APHIDIINAE.....	1
1.2 MORFOLOGIJA POTFAMILIJE APHIDIINAE.....	6
1.3 BIOLOŠKA KONTROLA.....	8
1.4 RAZLIČITE ADAPTACIJE I MEHANIZMI ODBRANE DOMAĆINA.....	9
1.5 FILOGENIJA FAMILIJE BRACONIDAE.....	12
1.6 FILOGENIJA POTFAMILIJE APHIDIINAE.....	15
1.7 ROD <i>EPHEDRUS</i> .....	21
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	28
3. MATERIJAL I METODE.....	29
3.1 SAKUPLJANJE UZORAKA.....	29
3.2 MOLEKULARNA ANALIZA.....	31
4. REZULTATI.....	34
4.1 MORFOLOŠKA ANALIZA.....	46
4.2 OPIS DVE NOVE VRSTE.....	50
4.3 SINONIMIZACIJA.....	56
4.4 PODRODOVI I GRUPE VRSTA RODA <i>EPHEDRUS</i> U EVROPI.....	58
5. DISKUSIJA.....	78
6. ZAKLJUČAK.....	86
7. REFERENCE.....	88



## UVOD

Insekti parazitoidi, njihovi fitofagni domaćini i biljke koje oni parazitiraju, čine dominantnu komponentu terestričnog biodiverziteta naše planete. Na osnovu trenutnih brojeva, organizmi direktno uključeni u ove tritrofičke interakcije (biljka – fitofagni insekt – parazitoid) čine nešto više od polovine svih poznatih vrsta (Price, 1980; Strong et al., 1984). Najveći deo insekatskih vrstaje i dalje neopisan, ali čak i ako se završi globalni popis svih insekatskih vrsta, najbrojniji će i dalje biti insekti parazitoidi u asocijacijama sa biljakama i fitofagnim insekatima (Hawkins, 1994; WCMC, 1992). S obzirom na ogroman broj uključenih vrsta, interakcije domaćina i parazitoida mogu biti izuzetno složene i moguć je gotovo bilo koji tip odnosa između ove dve grupe (Hawkins, 1994).

## BIOLOGIJA PARAZITOIDA POTFAMILIJE APHIDIINAE

Potfamilija Aphidiinae (Hymenoptera, Braconidae) obuhvata oko 500 vrsta (Dolphin & Quicke, 2001; Jones et al., 2009; Yu et al. 2012), klasifikovanih u oko 60 rodova. Sve vrste unutar ove potfamilije su obligatni koinobiontni endoparazitoidi biljnih vaši (Aphididae), koji se razvijaju i hrane na račun živog domaćina. Predstavnici ove potfamilije su sitni insekti, veličine najčešće od jedan do tri milimetra. Aphidiinae se mogu naći u velikom broju različitih ekosistema, a najveći broj opisanih vrsta potiče iz Holartičkog regiona.

U cilju razmnožavanja, ženka parazitoida mora da pronađe odgovarajućeg domaćina. Za ženku, nalaženje biljne vaši domaćina je presudno i ne uvek lako, s obzirom da postoji mogućnost da se eklozija iz mumije desila daleko od potencijalnog domaćina (Starý, 1988). Parazitoidi koriste čitav niz hemijskih i fizičkih orijentira tokom: a) lociranja staništa na kom se nalaze odgovarajuće biljne vaši, b) njihovog pronalaženja unutar staništa i c) ispitivanja da li je potencijalni domaćin pogodan za ovipoziciju (Vinson, 1974; Schmidt, 1991; Vet & Dicke, 1992; Turlings et al., 1993; Powell et al., 1998; Rehman, 1999). Parazitoidi moraju naći svoje domaćine u vrlo složenoj sredini. Smatra se da potraga

parazitoida nije nasumična, da oni prate razne “znakove” koje šalju biljke i biljne vaši i u skladu sa tim prilagođavaju svoje ponašanje (Vet, 1995).

Hemijski stimuli igraju značajnu ulogu na skoro svim nivoima pronalaženja domaćina. Parazitoidi koji napadaju polifagne vrste u manjoj meri koriste mirisne stimulse biljaka u pronalaženju domaćina. Razlog za to može biti što se njihovi domaćini hrane na velikom broju nesrodnih biljaka koje ispuštaju različite isparljive supstance. Takav je slučaj sa vrstom *Aphidius nigripes* Ashmead, 1901, koja parazitira polifagne biljne vaši i nije pokazala nikakvu reakciju na isparljiva mirisna jedinjenja koja ispuštaju infestirane biljke (Bouchard & Cloutier, 1985). Takođe, utvrđeno je da vrsta *Diaeretiella rapae* McIntosh, 1855, koja pokazuje visok stepen specijalizacije ka domaćinu *Brevycorine brassicae* Linnaeus, 1758, koristi kao orijentir miris biljke na kojoj se domaćin nalazi (Rehman & Powell, 2010).

U prisustvu velikog broja različitih vrsta biljnih vaši, kvalitet, brojnost i distribucija domaćina će uticati na izbor ženke parazitoida. Evolutivni trend kod potfamilije Aphidiinae ide ka oligofagiji, to jest, ka parazitiranju samo nekoliko vrsta biljnih vaši iz istog roda (Starý, 1988). Srodne biljne vaši su često napadane od strane srodnih vrsta parazitoida, što ide u prilog teoriji da parazitoidi koevoluiraju zajedno sa svojim domaćinima (Mackauer & Chow, 1986).

Nakon što ženka locira infestiranu biljku (mikrostanište), u daljem pronalasku odgovarajućeg domaćina, vizuelni i kontakti stimuli, kao i kornikalne sekrecije biljne vaši mogu imati značajnu ulogu. Pri lociranju i prepoznavanju domaćina, čulo vida je važno kod nekih vrsta (Battaglia et al., 1995; Michaud & Mackauer, 1994). Na primer, *Monoctonus crepidis* Haliday, 1834, parazitoid vaši *Nasonovia ribis-nigri* Hille Lis Lambers, 1949, u eksperimentu zastaje i ispituje sve tamne fleke na površini lista. U ovom slučaju, kretanje domaćina nije imalo uticaja na prepoznavanje, jer ženke nisu pravile razliku između aktivnih i anestetiziranih biljnih vaši (Griffiths, 1960). Ženke vrste *Aphidius ervi* Haliday, 1834 se “uzbude” kada vide biljne vaši koje su zatvorene u staklene kapilarne

cevčice, tako da se nikakvi hemijski stimuli ne mogu razmenjivati među njima, a parazitoid može čak putem vida praviti i razliku između različito obojenih morfi biljnih vaši (Tomanović et al., 1996; Caillaud & Lossey, 2010). Pokazano je da ženke roda *Praon* Haliday, 1833 mogu da razlikuju na svetlosti zelenu i ružičastu morfu biljnih vaši domaćina *Macrosiphon creelii* Davis, 1914, ali preferiraju da polažu jaja u zelene morfe, dok u mraku polažu jaja jednako i u ružičaste (Rehman & Powell, 2010). S druge strane, ženke vrste *Ephedrus californicus* Baker, 1909 reaguju na vaši samo nakon kontakta sa njima putem antena, iz čega se može zaključiti da čulo vida kod ove vrste ne igra ulogu u pronalaženju domaćina (Michaud & Mackauer, 1995).

Nakon lociranja domaćina i početnog kontakta, sledeći korak parazitoida je prihvatanje ili odustajanje od ovipozicije u biljnu vaš. Kad ženka sretne potencijalnog domaćina, putem antena i legalice procenjuje njegov kvalitet i podobnost za razvoj jaja (uzrasni stupanj, da li je inficiran gljivom ili bakterijom, da li je već parazitiran od strane iste vrste kao parazitoidna ženka – superparazitizam ili nekom drugom vrstom – multiparazitizam). Domaćin predstavlja ključan resurs za razviće parazitoidne larve.

Biljka na kojoj se hrane biljne vaši ima takođe bitnu ulogu u prepoznavanju i prihvatanju domaćina od strane parazitoida. U eksperimentalnim uslovima, parazitoid specijalizovan za biljne vaši koje napadaju žitarice, *Aphidius rhopalosiphi* de Stefani–Perez, 1902, napada domaćina (*Sitobion avenae* Fabricius, 1775) češće kada se vaši nalaze na pšenici nego na veštačkoj podlozi (Brahmah & van Emden, 1994). Takođe, moguće je da ovipozicija ima veze i sa stečenim iskustvom, pošto ženke radije napadaju vrstu biljne vaši iz koje su izašle (Eijsackers & van Lenteren, 1970; Rehman, 1999).

Važnu ulogu ima i razvojni stadijum biljne vaši, gde parazitoid može pokazati preferenciju ka određenim stadijumima (Liu et al., 1984). Na odabir domaćina utiču morfologija i ponašanje biljne vaši, koje variraju kod različitih stadijuma. Iako su svi stadijumi domaćina parazitirani, Aphidiinae se najčešće odlučuju na polaganje jaja u drugi i treći razvojni stadijum. Ovakva preferencija može biti rezultat efikasnog odbrambenog ponašanja četvrtog razvojnog stadijuma i adulta, dok je prvi razvojni stadijum suviše mali i

energetski neprihvatljiv (Rehman & Powell, 2010). Većina parazitoidnih vrsta može napadati veći broj razvojnih stadijuma domaćina, ali se samo nekoliko vrsta specijalizuje na parazitiranje krilatih adulata (Volkl & Mackauer, 1996).

Nakon što su locirale pogodnog domaćina, ženke vrše ovipoziciju podvlačeći metazomu ispod mezozome, tako da se legalica nalazi između srednjih nogu i usmerena je ka domaćinu. Ženke iz roda *Monoctonus* kao i druge iz tribusa *Trioxini* pri ovipoziciji hvataju domaćina prednjim nogama (Griffiths, 1960; Volkl & Mackauer, 1996). Ženkama vrste *M. crepidis* Haliday, 1834 treba i do 15 sekundi da polože jaje, a polažu ga u ganglionarnu masu domaćina (Griffiths, 1961), kao i *M. paulensis* (Calvert & van den Bosch, 1972). Volkl i Mackauer (2000) su izučavali tip ovipozicije kod 49 vrsta iz 19 rodova afidiina i klasifikovali ponašanje u šest grupa na osnovu brzine ovipozicije i da li je tokom nje parazitoid pridržavao domaćina. Vrste roda *Ephedrus* pokazuju najmanje specijalizovano ponašanje tokom ovipozicije, jer ne pridržavaju domaćine i zahtevaju dosta vremena za inserciju jaja (Quicke, 2015), što najverovatnije predstavlja pleziomorfiju.

Parazitirana biljna vaš nastavlja sa hranjenjem, rastom i razvojem, dok se larva parazitoidea hrani na njen račun i prolazi kroz nekoliko stadijuma pre konačnog ulutkavanja. Većina rodova potfamilje Aphidiinae pravi slab kokon unutar mumificirane i naduvene ljuštore domaćina (“mumija”), dok larve tribusa *Praeni* (*Praon*, *Areopraon* Mackauer, 1959 i *Dyscritulus* Hincks, 1943) isecaju ventralnu površinu mumije i prave kokon u obliku diska između mumije i lista. Kod nekih taksona, ovakvo ponašanje je promenljivo (Quicke, 2015). Na primer kod vrste *Pseudopraon mindariphagum* Stry, 1975, larve koje ne ulaze u dijapauzu razvijaju se u mumiji, dok one koje ulaze u dijapauzu grade spoljašnji kokon ispod domaćina (Stary, 1975), a oba tipa ulutkavanja dešavaju se kod nekih vrsta iz roda *Areopraon* (Tomanović et al., 2006; Mackauer & Finlayson, 2012). Kod ovog roda, varijacija je najverovatnije adaptivna i moguće je da kokon, zakačen direktno na biljku, ima manje šanse da se spere usled kiše (Quicke, 2015).

Fekunditet afidiina može biti veoma visok. Ženke nose do 800 jaja (najčešće 150–200) i pored toga što je životni vek adulta prilično kratak (otprilike nedelju dana) (van Steenis, 1994; Latham & Mills, 2010).

Superparazitizam je čest (kao i multiparazitizam) i borba između larvi prvog stadijuma je normalna pojava (Chow & Sullivan, 1984; Ming et al., 2003), iako samo povremeno više od jedne jedinke preživi da izađe iz iste mumije (Mackauer & Chow, 2012). Najčešće, jednu vrstu domaćina napada nekoliko vrsta parazitoida. Zbog toga, ženke parazitoida često nailaze na domaćina u kome se nalazi jaje druge vrste. Kada se ženka susretne sa takvim domaćinom, ona će ga ispitati i odlučiti da li da položi jaje u njega ili ne (Hagvar & Hofsvang, 1991). Vinson (1976, 1984) tvrdi da na telu domaćina koji je parazitiran postoje spoljašnji markeri specifični za vrstu, ali da oni ne mogu sprečiti dodatno polaganje jaja od strane druge vrste u slučaju nedostatka domaćina. Mnoge studije (Waage & Hassell, 1982; Hagvar, 1989; van Alphen & Visser, 1990) sugerišu da je multiparazitizam češći od superparazitizma. Kada dođe do polaganja više jaja različitih vrsta u istu biljnu vaš, dolazi do kompeticije larvi koje su u njoj započele razviće. Takođe, ženke parazitoida mogu tokom ovipozicije prouzrokovati smrt larve kompetitora koja se već nalazi u domaćinu, putem ubrizgavanja različitih toksičnih supstanci (Mackauer, 1990). Konkurentna jaja i larve mogu biti eliminisana fizičkim napadom (mandibulama) ili fiziološkom supresijom (toksinom ili uskraćivanjem hrane), a obično starija larva preživi (Hagvar & Hofsvang, 1991).

Ženke parazitoida poseduju sposobnost da raspoznaju koji domaćin je već parazitiran i obično odlučuju da u njega ne polože jaje. Sposobnost da prepoznaju da li je domaćin već parazitiran od strane iste vrste široko je rasprostranjena u nekoliko familija parazitoida opnokrilaca, kako solitarnih tako i gregarnih. Način na koji prepoznaju parazitiranog domaćina je verovatno pomoću nekih spoljašnjih ili unutrašnjih markera (Hagvar & Hofsvang, 1991). Sada se uglavnom prihvata stanovište da je spoljašnji marker hemijske prirode, a ne legalicom zagrebana površina domaćina (Strand, 1986). Unutrašnji markeri su

slabije poznati, ali najverovatnije imaju veze sa “kvalitetom” domaćina, kao što su to na primer fiziološke promene usled razvijanja jaja parazitoida (Chow i Mackauer, 1986).

## MORFOLOGIJA POTFAMILIJE APHIDIINAE

Opšti plan građe parazitoida potfamilije Aphidiinae odgovara morfologiji familije Braconidae.

Prema položaju usnog aparata, glava pripada ortognatnom tipu. Klipeus je konveksan, najčešće ovalan, na njemu se nalazi različit broj seta (Starý, 1970), a na granici klipeusa i lica smeštene su tentorijalne jamice. Mandibule su dvozube, a broj segmenata maksilarnih i labijalnih palpusa je varijabilan. Na glavi se nalazi par složenih očiju i tri ocele koje su pozicionirane na temenu. Između složenih očiju nalaze se antenalna udubljenja (*antennal sockets*), iz kojih polaze antene. Končaste antene se sastoje iz skapusa, pedicela i flageluma, kojeg čini različiti broj segmenata (od 8 do 30) (Starý 1970). Na flagelarnim segmentima su česta pojava i mirisne brazde, *rhinariae*. One predstavljaju važan taksonomski karakter na nivou roda ili vrste (Gärdenfors, 1986).

Kao i kod ostalih članova Parasitica grupe, kod afidiina je prvi tergite, propodeum, fuzionisan sa grudnim delom, pa je iz tog razloga ispravnija podela tela na mezozomu i metazomu, nego na toraks i abdomen (Gärdenfors, 1986; Wharton & Sharkey, 1997). Kao i ostale Braconidae, Aphidiinae imaju tri para dobro razvijenih nogu, prilagođenih za što efikasniju pripremu za parazitiranje domaćina. Mezosoma je građena iz protoraksa, mezotoraksa i metatoraksa kojima je pripojen i propodeum. Glava je povezana sa pronotumom preko membranoznog spoja koji iz dorzalnog ugla ima oblik slova *U*. Na protoraksu se nalazi prvi par nogu. Dorzalni deo mezotoraksa je podeljen na dva sklerita koja mogu značajno varirati u obliku: mezoskutum i skutelum. Na mezoskutumu se često nalaze parne brazde, *notauli*, koje označavaju mesta spajanja mišića koji se koriste pri

letenju (Quicke, 2015). Na mezotoraksu se nalazi prednji par krila i drugi par nogu, dok se na metatoraksu nalazi zadnji par krila i treći par nogu. Poslednji deo mezozome naziva se propodeum, a može biti potpuno gladak ili u različitoj meri skulptuiran, pri čemu grebeni mogu deliti njegovu površinu na areole. Krila su uglavnom dobro razvijena, mada postoje izuzeci, odnosno apterne ili brahipterne forme (Chaubet et al., 2013). Nervatura krila je dobro razvijena kod roda *Ephedrus*, sa sedam zatvorenih ćelija, dok je kod ostalih rodova ispoljena redukcija određenih nerava, odnosno krilne nervature (Starý, 1970). Sklerotizovani kostalni i subkostalni nerv su srasli, a njihovo proširenje u vršnom delu naziva se pterostigma. Evolutivni trend unutar potfamilije ide ka redukciji krilne nervature, pa je zbog toga kod evolutivno mlađih rodova ona u većoj meri redukovana (Sharkey & Wharton, 1997). Metazoma započinje manje ili više izduženim prvim metazomalnim segmentom, petiolusom, na koga se nastavljaju nepokretno srasli drugi i treći metazomalni segment, što je glavna karakteristika koja potfamiliju Aphidiinae odvaja od ostalih članova familije Braconidae.

Genitalni aparat ženki (legalica) građen je iz 8. i 9. metazomalnog segmenta (Žikić, 2008). Legalicu čine kvadratne ploče, valviferi 1 i 2 i tri para valvi kojima se ubada domaćin (Starý, 1976). Genitalni sistem mužjaka je slične građe kao i kod ostalih Hymenoptera (Pennacchio et al., 1988).

## BIOLOŠKA KONTROLA

Afidiine su jedna od najintenzivnije proučavanih grupa porodice Braconidae, najvećim delom zbog toga što pojedine vrste imaju veliki potencijal u biološkoj kontroli biljnih vaši.

Više od 20 vrsta ove potporodice je korišćeno u većem broju biokontrolnih projekata radi suzbijanja alohtonih i invazivnih vrsta biljnih vaši širom sveta (Hagvar & Hofsvang, 1991), a otprilike 20% od ukupnog broja projekata je bilo uspešno (Hirose, 2006). Najveći broj introdukcija afidiina u cilju biološke kontrole vaši sproveden je ili u staklenicima [npr. vrste *Praon volucre* Haliday, 1833 protiv *Uroleucon ambrosiae* Thomas, 1878 (De Conti et al., 2008) i *Ephedrus persicae* Froggatt, 1904 protiv *Myzus persicae* Sulzer, 1776 (Hagvar & Hofsvang, 1979)] ili u toplijem klimatskom pojasu. U umerenim regionima, afidiine su bile uspešne u kontroli vaši, ali nije bilo tako lako održavati njihovu brojnost (Quicke, 2015). *Binodoxys communis* Gahan, 1926 je introdukovan iz Azije u Severnu Ameriku i pušten je u nekoliko zemalja u cilju kontrole biljne vaši *Aphis glycines* Matsumura, 1971, vrlo bitne ekonomske štetočine (Quicke, 2015). *Trioxys pallidus* Haliday, 1933 je uspešno korišćen u kontroli orahove vaši *Chromaphis juglandicola* Kaltenbach, 1846 u Kaliforniji, međutim, bile su uspešne samo jedinke donete iz odgovarajućeg klimatskog regiona (Irana) (van den Bosch et al., 1982), dok su introdukcije iz hladnijih delova sveta bile uspešne u severnijoj državi, Oregonu. Vrsta *Lipolexis oregmae* Hagan, 1932 je introdukovana iz Guama u Floridu u pokušaju da se suzbije populacija citrusne vaši, *Toxoptera citricola* (= *Aphis citricidus* Kirkaldy, 1907) (Persad et al., 2007).

Širenje parazitoida u introdukovanom staništu između ostalog zavisi i od stadijuma domaćina kojeg parazitiraju. Olkowski et al. (1982) su otkrili da se *Trioxys tenuicaudus* Stary, 1978, u Kaliforniji u cilju kontrole vaši *Tinocallis platani* Kaltenbach, 1843, za par godina proširio samo nekoliko gradskih blokova. Razlog za to je što ova vrsta skoro u potpunosti parazitira samo rane beskrilne stadijume vaši. Druge vrste koje napadaju kasne stadijume nimfi ili krilate adulte, kao što je *B. communis*, imaju potencijal da se prošire znatno dalje u kraćem vremenskom roku (Zhang et al., 2012).



## RAZLIČITE ADAPTACIJE I MEHANIZMI ODBRANE DOMAĆINA

Spektar domačina je najčešće vrlo uzan i većina vrsta parazitira samo jedan ili nekoliko srodnih rodova biljnih vaši. Međutim, neke vrste su veoma polifagne i parazitiraju i razvijaju se u taksonomski raznovrsnim domačinima koji žive istovremeno na istom staništu (Mackauer & Starý, 1967; Starý, 1970; Starý & Rajmanek, 1981).

Članovi roda *Pauesia* Quilis, 1931 su specijalizovani za parazitiranje biljnih vaši tribusa Cinarini, a neke Aphidiinae su posebno povezane sa biljnim vašima koje čuvaju mravi (*Lysiphlebus cardui* Marshall, 1896, *L. fabarum* Marshall, 1896, *L. hirticornis* Mackauer, 1960, *Paralipsis enervis* Nees, 1834, *Pauesia picta* Haliday, 1834 i *Protaphidius wissmannii* Ratyeburg, 1848) (Starý, 1987). Drugi, iako ne potpuno specijalizovani za kolonije domačina koje čuvaju mravi, preferiraju njih; na primer, *Pauesia pini* Haliday, 1834, koja polaže više jaja u koloniji vaši *Cinara* gde su prisutni mravi (Volkl & Novak, 1997). Mravi ne napadaju ove parazitoide iz dva razloga. Prvi je način na koji se parazitoidi ponašaju, a drugi taj što poseduju ugljovodonični kutikularni sloj koji imitira onaj kod mrava koji brinu o biljnim vašima – pojava hemijske mimikrije (Volkl & Mackauer, 1993; Liepert & Detner, 1996, Dieckhoff & Heimpel, 2010). U većini slučajeva, mravi brane svoje kolonije biljnih vaši i ako prepoznaju parazitoida, napašće ga i pokušati da ga ubiju, pored toga što selektivno napadaju i mumije (Wyckhuys et al., 2007). Mimikrija parazitoida ka izgledu mrava je u pojedinim slučajevima otišla i dalje. Vrsta *L. fabarum* je jedinstvena u sakupljanju medljike od biljnih vaši, *Aphis fabae* Scopoli, 1763, tako što ih antenama stimuliše na način na koji to rade mravi koji se brinu o vašima (Rasekh et al., 2010). Hemijska i ponašajna mimikrija koju ispoljava *P. enervis* mu omogućava da putem trofilaksije dobija hranu od mrava vrste *Lasius niger* Linnaeus, 1758 (Volkl et al., 1996). Ovaj parazitoid ne može preživeti bez asocijacije sa mravima, pa zbog toga ne parazitira biljne vaši koje ne čuvaju mravi.

Beskrlnost je retka kod afidiina. Unutar roda *Diaeretellus*, ženke vrste *D. ephippium* Haliday, 1833 su beskrilne, dok mužjaci poseduju potpuno razvijena krila (Quicke, 2015).

Takođe, vrsta *D. svalbardicum* Chaubet, 2013 ispoljava vrlo neobičnu pojavu kod oba pola, krilni polimorfizam (makropterne i mikropterne jedinice) (Chaubet et al., 2013). Gärdenfors (1990) je opisao beskrlnu vrstu roda *Trioxys* iz Ekvadora, dok je u bambusovim šumama Kenije opisana još jedna beskrlna vrsta, *Autriquella aptera* Starý, 1988, kod koje su oba pola beskrlna (Starý, 1988). Biologija ove vrste je nepoznata, ali je ona morfološki slična mravima, što navodi na mogućnost da parazitira kolonije koje čuvaju mravi (Starý, 1988).

Grupisanje domaćina u guste kolonije ima uticaj i na parazitoide. Neki naučnici takvo ponašanje nazivaju kvazi-gregarnim, mada ono što one rade nije ništa drugačije od ponašanja nekih brakonida (npr. *Cotesia glomerata* Linnaeus, 1758), gde iskorišćavaju što je više moguće jedinice u kolonijama, postepeno ih parazitirajući, jednu po jednu (Quicke, 2015). Pojedine vrste parazitoida imaju selektivan pristup u odabiru kolonije koju će napasti. Almohamad i Hance (2014) su otkrili da *A. ervi* izbegava kolonije biljnih vaši u kojima se nalaze lutajuće larve dva afidna predatora, *Episyrphus balteatus* DeGeer, 1776 (Syrphidae) i azijske bubamare, *Harmonia axyridis* Pallas, 1773 (Coccinellidae), a takođe izbegavaju i površine na kojima se nalaze njihovi tragovi ili ekskrementi. Ovakvo ponašanje ima smisla, jer ako ženke polože jaja u koloniju biljnih vaši gde se takođe nalaze i larve predatora, postoji velika šansa da će biljne vaši sa jajima parazitoida biti pojedene.

Hemija toksina parazitoida proučavana je od strane Tremblay et al. (1998) i Falabella et al. (2007). Nekoliko vrsta indukuje prolaznu paralizu domaćina, a Calvert & van den Bosch (1972) predložili su da je to možda samo posledica polaganja jaja u ganglije domaćina, ili kao što je Wharton (1993) primetio, da razlike između privremene paralize uzrokovane toksinom i ponašajne nepokretljivosti uzrokovane šokom od ovipozicije nije uvek lako razdvojiti. Hagvar (1988) je otkrio da je toksin vrste *Ephedrus cerasicola* Starý, 1962 najverovatnije odgovoran za ubijanje larve *Aphidius matricariae*, sa kojim je u kompeticiji, ako je ona već prisutna u domaćinu. Pored fizioloških promena, parazitizam takođe dovodi i do promena u ponašanju domaćina, kako im se približava smrt (Quicke, 2015). Na primer, Brodeur i McNeil (1990) su pokazali da vaši *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, 1878, koje su parazitirane od strane *Aphidius nigripes* larve koja ulazi u dijapauzu, traže tamnija,

zaštićena mesta dalje od biljke na kojoj se nalaze, pre nego što se mumificiraju, dok one koje u sebi nose larvu koja ne ulazi u dijapauzu nastoje da ostanu na biljci i tu se mumificiraju.

Za razliku od većine drugih domaćina, biljne vaši mogu eliminisati jaja parazitoida humoralnim mehanizmom, dok se u nekim slučajevima obuhvataju kapsulom (Henter & Via, 1995). Od četiri proučavana domaćina, Griffiths (1961) je otkrio da *Aulacorthum* (*Neomyzus*) *circumflexum* Buckton, 1876 formira braon kapsulu (poreklom od hemolimfe) oko jaja parazitoida *M. crepidis*, ali je navodno ovakav odgovor vrlo redak. Imunološka situacija između afidiina i njihovih domaćina je takođe donekle atipična iz razloga što su interakcije između njih modifikovane od strane različitih simbiotskih bakterija unutar biljne vaši. Biljne vaši su u obligatnoj simbiozi sa bakterijama iz roda *Buchnera* koji se nalaze unutar specijalizovanih ćelija bakteriocita i imaju važnu ulogu u sintezi aminokiselina (Quicke, 2015). Ako su se parazitoidi izlegli iz biljnih vaši kojima su uklonjene simbiotske bakterije (tako što su hranjene određenim antibiotikom), manji su i rastu sporije od onih čiji je domaćin posedovao simbiotske bakterije (Pennacchio et al., 1999). Dalje, mnogo biljnih vaši poseduje i sekundarne endosimbiotske bakterije. Na primer, biljne vaši *Acyrtosyphon pisum* Harris, 1776, mogu imati jednu ili više vrsta bakterija kao što su *Regiella insecticola*, *Serratia symbiotica* ili *Hamiltonella defensa* kao simbiota (Quicke, 2015). Ovi sekundarni simbioti ne samo da utiču na sposobnost biljne vaši da se razvije na određenoj biljnoj hrani, već učestvuju i u odbrani od parazitizma (Oliver et al., 2003, 2005). Nyabuga et al. (2010) su istraživali otpornost vaši *A. pisum* na parazitoida *A. ervi* i otkrili da *R. insecticola* sama utiče na otpornost, kao i različite koinfekcije između drugih endosimbionata.

Na kraju, debljina kutikule i odbrambeno ponašanje, kao što su ritanje, udaranje, bežanje ili padanje sa biljke su primeri ponašanja koje zavisi od razvojnog stadijuma i koje može uticati na uspeh ovipozicije (Rasekh et al., 2010; Quicke, 2015).

## FILOGENIJA FAMILIJE BRACONIDAE

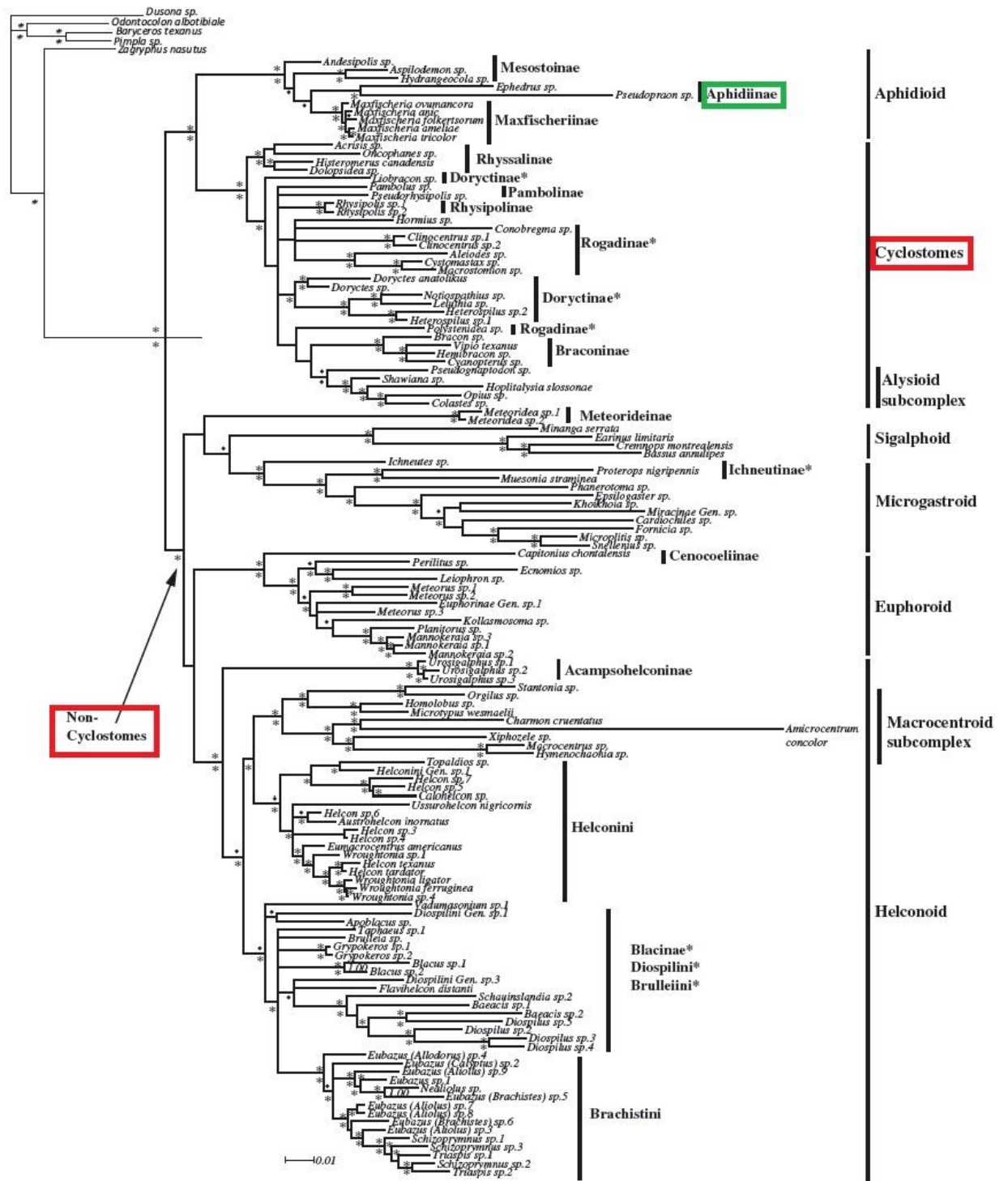
Familija Braconidae je jedna od najbrojnijih unutar reda Hymenoptera, sa preko 17500 opisanih vrsta (Yu et al., 2004) i procene su da najmanje 25000 vrsta još nije opisano (Jones et al., 2009). Braconidae su najrodnije familiji Ichneumonidae, i zajedno sa njom svrstavaju se u natfamiliju Ichneumonoidea (Sharanowski et al., 2011).

Rekonstrukcija filogenetskih odnosa unutar porodice Braconidae je zaokupljala pažnju istraživača iz različitih disciplina. Pored njihove važne uloge u biološkoj kontroli (Austin & Dowton, 2009), Braconidae pružaju odličan model sistem u istraživanjima biodiverziteta i konzervacione biologije (Lewis & Whitfield, 1999), a takođe i u evolutivnim studijama razvoja parazitizma (Shaw, 1983; Gauld, 1988; Belshaw & Quicke, 2002), interakciji domaćin-parazitoid (Strand, 2000), morfološkim adaptacijama i konvergenciji (Belshaw et al., 2003). Jedan od najvećih izazova u istraživanju sistematike ove porodice je nemogućnost razrešavanja filogenetskih odnosa među potfamilijama. Deo tih poteškoća potiče od ogromne raznolikosti unutar familije Braconidae, jer je sakupljanje uzoraka za obimne molekularne i morfološke studije često izuzetno naporno i nepraktično (Sharanowski et al., 2011). Korisne morfološke karaktere često je teško proceniti zbog visokog nivoa konvergencije među fenotipovima prilagođenim na određenu grupu domaćina (Quicke et al., 1999). Dodatno, molekularna istraživanja su tipično fokusirana na kratke sekvence gena rDNK i mtDNK (Belshaw et al., 2000; Chen et al., 2003; Pitz et al., 2007). Iako je relativno lako amplifikovati ove gene kroz širok spektar taksona, njihova upotrebna vrednost je ograničena u rešavanju odnosa potfamilija unutar familije Braconidae (Sharanowski et al., 2011). Još jedna činjenica koja znatno otežava sistematiku porodice Braconidae je varijabilnost u šemama klasifikacije. Broj priznatih potfamilija kreće se od 17 do 50, bez univerzalno prihvaćene klasifikacije (Sharanowski et al., 2011).

Članovi porodice Braconidae se tipično dele na dve neformalne grupe, na osnovu morfologije usnog aparata: na ciklostomnu grupu, sa depresijom na klipeusu i na

neciklostomnu grupu, čije jedinke imaju klipeus koji u potpunosti prekriva prednji deo usnog otvora (Wharton, 1993). Svi članovi linije neciklostoma su endoparazitoidi, dok članovi ciklostoma ispoljavaju širok spektar životnih biologija (Quicke & van Achterberg, 1990). Iako prethodno navedene studije (Belshaw et al., 2000; Chen et al., 2003) predlažu da ove dve grupe formiraju prirodne linije, morfološki i molekularni podaci, kao i kombinovane analize pokazuju da to nije sasvim tačno (Zaldivar-Riveron et al., 2006; Pitz et al., 2007). Postoje tri hipoteze filogenije porodice Braconidae. Prva ističe da su neciklostomne linije koje vode poreklo od predaka ciklostoma (Čapek, 1970; Quicke & van Achterberg, 1990). Druga hipoteza predlaže da su neciklostome sestrinska grupa ciklostomama, a da su obe evoluirale od nepoznatog pretka, verovatno ektoparazita ksilofagne larve tvrdokrilaca (Wharton et al., 1992; Belshaw et al., 2000; Shi et al., 2005; Pitz et al., 2007) (Slika 1). Treća hipoteza postavlja neciklostome kao bazalnu kladu koja vodi do ciklostoma (Dowton et al., 1998).

Do danas, dokazi koji bi u potpunosti podržali bilo koju od navedenih hipoteza i dalje ne postoje. Na osnovu navedenog, može se zaključiti da su hipoteze o filogenetskim odnosima unutar familije Braconidae dosta varijabilne, bez obzira da li se radi o molekularnim ili morfološkim karakteristikama.

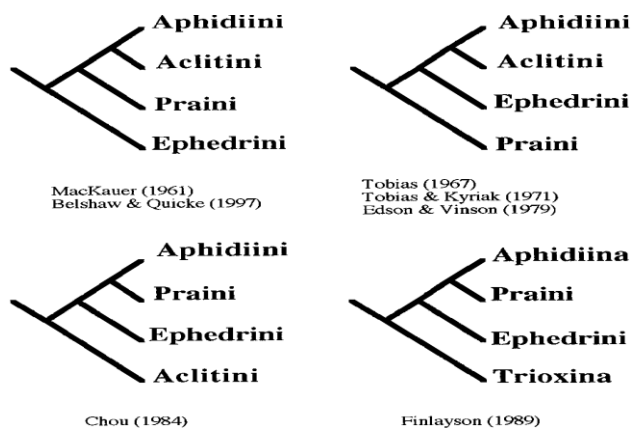


Slika 1. Filogenija familije Braconidae rekonstruisana Bajesovom analizom 28s rDNK, 18s rDNK i dva protein kodirajuća gena, CAD i ACC (preuzeto iz Sharanowski et al., 2011).

## FILOGENIJA POTFAMILIJE APHIDIINAE

Iako Aphidiinae poseduju veći broj sinapomornih karaktera, značajne razlike postoje u morfologiji, biologiji i ponašanju između tribusa, rodova i vrsta ove potfamilije. Usled različite interpretacije ovih razlika, postoji dosta nesuglasica oko filogenetskog položaja različitih taksona (Slika 2).

Trembley & Calvert (1971) su ispitivali taksonomski položaj vrsta na osnovu embriologije. U svojoj studiji prepoznali su dva oblika jaja kod potfamilije Aphidiinae: jedan izduženi ovalan i drugi oblika limuna. Mapiranje ovih podataka na filogenetsko stablo, sugerisalo je da izdužena ovalna jaja predstavljaju pleziomorfnu osobinu, dok je oblik limuna apomorfno stanje. Dalje, O'Donnell (1989) je ispitivao oblik mandibula kod larvi početnog razvojnog stadijuma i zaključio da postoje dva oblika: oblik kuke i oblik srpa. U ovom slučaju, Smith & Kambhampati (2000) su zaključili da je oblik kuke pleziomorfno stanje sa jednom evolutivnom tranzicijom ka mandibulama oblika srpa.



Slika 2. Predloženi filogenetski odnosi klada potfamilije Aphidiinae po autorima Mackauer (1961), Belshaw & Quicke (1997), Tobias (1967), Tobias & Kyriak (1971), Edson & Vinson (1979), Chou (1984), Finlayson (1989) (preuzeto iz Smith et al., 1999).

Kod parazitoida familije Braconidae mogu se naći dva različita tipa aparata koji sintetišu i luče toksin, a koji se po Edson & Vinson (1979) sastoje iz dela gde se toksin skladišti (rezervoara), žlezdanih filamenata i cevi koja je povezana sa legalicom. Po ovim autorima jedan tip otrovnih žlezda ima rezervoar kupastog oblika koji je okružen sa velikim brojem mišića i dva ili više žlezdanih filamenata, a najčešće se nalazi kod ekto- i endoparazitoida koji se razvijaju unutar ostataka domaćina. Drugi tip otrovnih žlezda poseduje tanak zid rezervoara, koji je okružen sa nekoliko mišića i samo dva žlezdana filamenta, a najčešće se nalazi kod parazitoida koji se razvijaju van ostataka domaćina. Kod potfamilije Aphidiinae se mogu naći oba tipa ovih žlezda, za razliku od ostalih brakonidnih potfamilija koje imaju samo jedan tip. Ovakva klasifikaciona šema Edson & Vinson (1979) je u skladu sa rezultatima i filogenetskim stablom Smith & Kambhampati (2000), gde se mogu uočiti četiri različite evolutivne linije. Po ovim autorima, pleziomorfno stanje je aparat drugog tipa, sa neuočljivim rezervoarom, a nalazi se kod tribusa Praini, dok je apomorfno stanje prvi tip otrovnih žlezda.

Prema Starý (1981), ploče legalice i njihova funkcionalna diferencijacija su jedan od ključnih karaktera u istraživanju evolucije potfamilije Aphidiinae. Filogenetsko stablo Smith & Kambhampati (2000) dobijeno na osnovu analiza podataka oblika i veličine ploča legalice, takođe ukazuje na postojanje četiri evolutivne linije.

Iako je najveći broj vrsta potfamilije Aphidiinae sa severne hemisfere, gde su domaćini mnogobrojni i raznovrsni, postoji i određeni broj endemičnih afrotropskih, novozelandskih i čileanskih rodova, iako na žalost podaci o domaćinima za većinu vrsta ne postoje (Quicke, 2015). Prisutnost i endemičnost nekoliko rodova u južnim delovima sveta (*Parephedrus*, *Pseudephedrus*, *Vanhartenia*), koji ispoljavaju pleziomorfne karaktere i za koje se smatra da predstavljaju odvojenu arhaičnu grupu potfamilije Aphidiinae, navode naučnike na gondvansko poreklo ove familije (Schlinger, 1974; Gärdenfors, 1986; Belshaw et al., 2000; Sharanowski et al., 2011).



Da su Aphidiinae postale rano u evoluciji porodice Braconidae, može se nagovestiti i nedavnim otkrićem fosila u španskom ćilibaru koji datira iz rane krede (Ortega-Blanco et al., 2009). Međutim, iako fosil umnogome liči na predstavnika Aphidiinae, ne postoje jasne sinapomorfne karakteristike. Njegovo pripajanje ovoj potporodici je većinom bazirano na nervaturi krila koja nalikuje na nervaturu kod Ephedrini, bez obzira na činjenicu da poseduje jasnu analnu venu koja je odsutna kod svih recentnih Aphidiinae (Quicke, 2015). Međutim, ako ova vrsta zaista jeste pripadnik Aphidiinae, kao što naglašavaju i Ortega-Blanco et al. (2009), to bi ponovo pokrenulo pitanje o Gondvanskom poreklu potporodice, koje je proisteklo iz studije Belshaw et al. (2000).

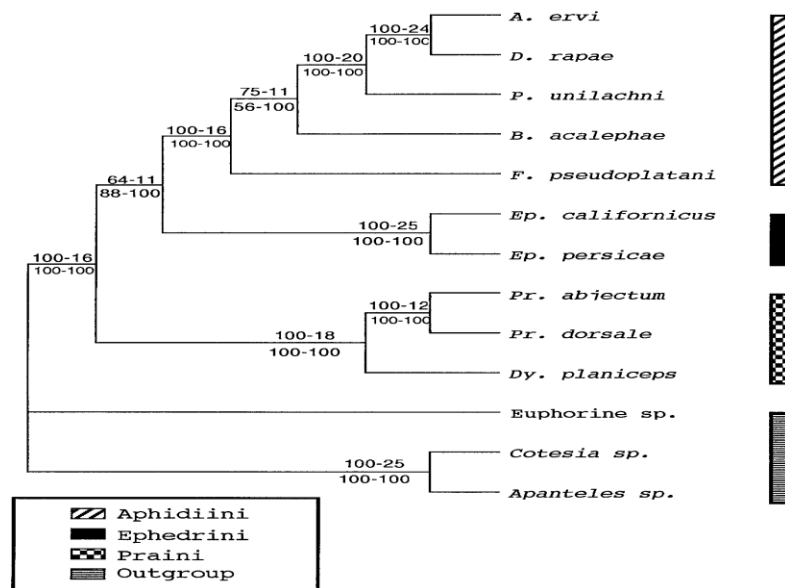
Prva molekularna istraživanja potporodice Aphidiinae sproveli su Belshaw & Quicke (1997), a rezultati njihovih analiza išli su u prilog bazalne pozicije tribusa Ephedrini. Još tri molekularne filogenije slede ubrzo nakon ove studije. U naredne dve godine, prvo Smith et al. (1999), a zatim i Sanchis et al. (2000) i Kambhampati et al. (2000) objavljuju svoja molekularna istraživanja. Smith et al. (1999) (Slika 3) kao marker koriste NADH1 dehidrogenazu i 28s rDNK, Sanchis et al. (2000) 18s rRNK (Slika 4), a Kambhampati et al. (2000) 16s rRNK. Dok su rezultati analiza Sanchis et al. (2000) bili u skladu sa Belshaw i Quicke (1997), gde je tribus Ephedrini bio bazalan, filogenija Smith et al. (1999) smešta kao bazalnog tribus Praini. Kambhampati et al. (2000) su jedini od navedenih autora koji su u svoju studiju uvrstili i potencijalno bazalni tribus Aclitini. Njihovo istraživanje ukazuje na sledeće odnose: Aclitini + (Praini + (Ephedrini + Aphidini)). Iako je rod *Aclitus* bazalan, predstavljen je samo jednom vrstom (*Aclitus obscuripennis* Förster) i njegova pozicija nema jaku kvantitativnu podršku. Kombinovani rezultati analiza NADH1 i 16s rDNK za 27 taksona koji spadaju u 14 rodova (bez roda *Aclitus*) koje su sproveli isti autori ukazuje na topologiju koja je gotovo identična onoj koju su objavili Smith et al. (1999), samo sa jačom kvantitativnom podrškom. Isti rezultat, ali sa manjom podrškom, dobili su i Dowton et al. (1998).

Međutim, filogenetski odnosi unutar potporodice su i dalje nerešeni, pošto su različiti setovi podataka često nepotpuni usled poteškoća u proučavanju svih značajnijih taksona u

isto vreme. Zbog toga, iako mnogi autori priznaju postojanje četiri prirodne grupe (Ephedrini, Praini, Trioxini i Aphidiini), ne postoji saglasnost o njihovom taksonomskom statusu.

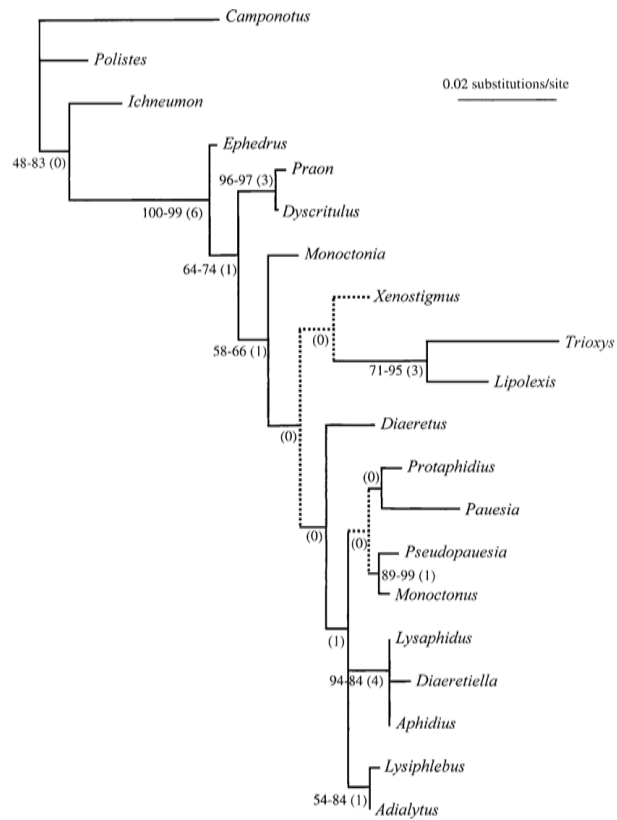
Zavisno od toga koji se kriterijum koristi, poslednje dve klade (Trioxini i Aphidiini) se tretiraju ili kao nezavisni tribusi (Belshaw & Quicke, 1997) ili se grupišu u isti tribus, usled čega neki autori spominju hipotezu tri tribusa: Ephedrini, Praini i Aphidiini (Tobias, 1967; Smith et al., 1999). U odnosu na njihove spoljašnje i unutrašnje morfološke karaktere, Aphidiinae se mogu podeliti na dva glavna kompleksa: jedan, koji pokazuje generalno primitivne brakonidne karakteristike (Ephedrini + Praini), kao što su razvijenija nervatura krila i dugi ovarijumi, i drugi, koji poseduje karaktere koji su evoluirali ka većoj specijalizaciji (Aphidiini + Trioxini), posebno kada se govori o izvedenijem reproduktivnom sistemu (LeRalec, 1993) i trendu redukcije nervature krila (Sanchis et al., 2000).

Najčešći DNK regioni koji se koriste u rasvetljavanju filogenetskih odnosa unutar potfamilije Aphidiinae su: 18s rDNK, 16s rRNK, 28s rRNK, COI, LWRh (dugotalasni rodopsin), ATPaza 6, citohrom b (cytb), elongacioni faktor 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), natrijum dehidrogenaza 1 (NADH1) i arginin kinaza (ArgK) (Derocles et al., 2015).



Slika 3. Konsenzus stablo potfamilije Aphidiinae, rekonstruisano na osnovu Maximum Parsimony (MP) metode, analizom NADH1 i 28s RNK gena (preuzeto iz Smith et al., 1999).

Većina autora se slaže da su Ephedrini i Praini najstarije klade ove potfamilije (Mackauer, 1968; Mackauer & Starý, 1967; Starý, 1970; Gärdenfors, 1986; O'Donnell, 1989; Finlayson, 1990), s obzirom na to da pokazuju velik broj primitivnih brakonidnih karakteristika, i u larvalnoj i u adultnoj morfologiji.



Slika 4. Konsenzus filogenetsko stablo potfamilije Aphidiinae, rekonstruisano na osnovu Neighbour Joining (NJ), Maximum Parimony (MP) i Maximum Likelihood (ML) metoda, analizom 18s rDNK regiona (preuzeto iz Sanchis et al., 2000).

## ROD *EPHEDRUS*

Sa više od 40 opisanih vrsta širom sveta, rod *Ephedrus* je srednje veličine unutar potfamilije Aphidiinae (Akhtar et al., 2011). S obzirom na često opisivanje novih vrsta i promenu statusa već opisanih (sinonimizacija), ovaj broj nije konačan. U Evropi, rod *Ephedrus* je zastupljen sa 18 opisanih vrsta (Tabela 1), mada su još tri, *E. angustithoracicus*, *E. hyaloptericolus* i *E. manjurensis* zabeležene u evropskom delu Rusije (Kiriak, 1977). Međutim, njihov taksonomski status je nejasan, s obzirom da opisi odgovaraju već poznatim vrstama *E. nacheri* (*E. angustithoracicus*), *E. niger* (*E. hyaloptericolus*) i *E. plagiator* (*E. manjurensis*). Distribucija vrsta je prilično raznolika: pojedine, kao što su *E. persicae* i *E. plagiator* su rasprostranjene širom kontinenta, dok su neke ograničene samo na određeni mikrohabitat, kao na primer, *E. lonicerae* (Tomanović et al., 2007). Opseg parazitiranja različitih vrsta biljnih vaši varira od striktnih specijalista za samo jednu vrstu ili rod domaćina, pa do široko polifagnih vrsta (*E. persicae* i *E. plagiator*) za koje je zabeleženo da parazitiraju preko 100 vrsta biljnih vaši iz različitih tribusa (Gärdenfors, 1986; Žikić et al., 2009). Rezultati nekoliko nedavnih studija navode na zaključak da vrste generalisti unutar potfamilije Aphidiinae zapravo predstavljaju potencijalne komplekse kriptičnih vrsta (Mitrovski-Bogdanović et al., 2013, Derocles et al., 2016, Petrović et al., 2016). Rod *Ephedrus* se razlikuje od ostalih članova potfamilije Aphidiinae kako po morfologiji tako i po životnoj istoriji. Prednja krila poseduju sedam zatvorenih ćelija, antene su građene od 11 segmenata kod oba pola, mumije su crne, izletni otvor na mumiji poseduje kapicu u apikalnom delu i nemaju nikakvu specijalizaciju za ovipoziciju (Starý, 1974) (Slika 5). Kod svih vrsta ovog roda usni aparat poseduje maksilarne palpuse građene od četiri segmenta i labijalne građene od dva. Centralna areola propodeuma je pentagonalnog oblika. Nervatura krila je veoma dobro razvijena, što se smatra primitivnim karakterom unutar potfamilije Aphidiinae i po ovoj osobini su bliske brakonidnim precima. Kada su u pitanju krila, jedan od značajnih taksonomskih karaktera je i odnos dužine 3-RS i 2-RS nerava (Pennacchio et al. 1988).



Slika 5. *Ephedrus* sp. spoljašnji izgled

Kao i kod ostalih članova potfamilije Aphidiinae, kod vrsta roda *Ephedrus* izbor domaćina umnogome zavisi od nekoliko faktora: staništa u kom parazitoid vrši potragu za domaćinom, dostupnosti odgovarajućih vrsta biljnih vaši i sposobnosti da se prepozna odgovarajući domaćin. Mnoge vrste potfamilije Aphidiinae preferiraju jedno ili nekoliko staništa, na primer *E. niger*, koji se najčešće nalazi na otvorenim suvim staništima, i *E. lacertosus*, koji preferira područja pod šumama (Gärdenfors, 1986). Međutim, izbor staništa nije isključivo rezultat povoljne temperature i vlažnosti, već zavisi i od biljaka i biljnih vaši, to jest, od tritrofičkih asocijacija biljke, domaćina i parazitoida (Hagvar & Hofsvang, 1991).

Nekoliko vrsta ovog roda introdukovano je na različite kontinente u cilju biološke kontrole invazivnih vrsta biljnih vaši. Tako je iz Evrope u Australiju i na Novi Zeland introdukovano *E. plagiator* u cilju suzbijanja plave lucerkine vaši, *Acyrtosiphon kondoi* Shinji, 1938 (Carver, 1989). Isti parazitoid je introdukovano u Sjedinjene Američke Države iz Evroazije i Maroka kao prirodni neprijatelj žitne vaši *Diuraphis noxia* Kurdjumov, 1913, ali nije poznato da li se populacija uspostavila. Iz Ukrajine u Čile unete su tri vrste roda

*Ephedrus*: *E. cerasicola* (protiv *Metopolophium dirhodum* Walker, 1849), *E. nacheri* (protiv *D. noxia*) i *E. plagiator* (protiv *Sitobion fragariae* Walker, 1848 i *Metopolophium festucae* Theobald, 1917). Međutim, nakon terenskog istraživanja nekoliko godina kasnije, samo je *E. plagiator* ponovo detektovan (Starý, 1993). *Ephedrus nacheri* i *E. plagiator* su kao deo koktela parazitskih osa pušteni u Burundi, kako bi kontrolisali populacije zelene lucerkine vaši (*Acyrtosiphon pisum*) i crne repine vaši (*Aphis fabae*). I pored uspešne introdukcije nekoliko vrsta koje su puštene u isto vreme, ove dve vrste nisu uspostavile populacije u novoj sredini (Autrique et al., 1989). *Ephedrus plagiator* je takođe introdukovan na Uskršnja Ostrva (Pacifik) kao biološki agent u borbi protiv *Toxoptera aurantii* Boyer de Foscolombe, 1841, ali nakon toga, jedinke ove vrste nikada nisu sakupljene (Ripa et al., 1995).

Postoji nekoliko slučajeva u kojima su vrste roda *Ephedrus* korišćene u cilju kontrole populacija biljnih vaši u staklenicima. Najčešći i vrlo uspešan biološki agent je vrsta *E. cerasicola*, korišćena u suzbijanju *M. persicae*, ali takođe uspešna u eksperimentalnim uslovima protiv *Pentalonia nigronervosa* Coquerel, 1859 (Starý & Stechmann, 1990). Mitsunaga et al. (2015) predložili su upotrebu *E. nacheri* u staklenicima, kao alternativu vrstama roda *Aphidius* u borbi protiv *Aphis gossypii* Glover, 1877 i *M. persicae*. Rezultati njihove studije pokazali su da *E. nacheri* može uspešno parazitirati obe vrste biljnih vaši, ali da se populacija ovog parazitoida ne povećava dovoljno brzo da bi savladala brzo rastuće populacije štetočina. U proteklih 10 godina, *E. cerasicola* se masovno komercijalno uzgaja i prodaje u Evropi. Isti je slučaj i sa vrstom *E. plagiator*, s tim što je proizvodnja ove vrste znatno manja (Lantern, 2018).

Trenutno su, u okviru roda *Ephedrus*, opisana tri podroda: *Ephedrus*, *Lysephedrus* i *Breviephedrus*. Podrodovi *Breviephedrus* i *Lysephedrus* sadrže po jednu vrstu, *E. brevis* i *E. validus*, koje su usled specifičnih morfoloških karaktera smeštene u zasebne podrodove. Podrod *Ephedrus* se sastoji od tri grupe vrsta, *persicae*, *lacertosus* i *plagiator*, koje su dobijene uporednom analizom različitih morfoloških karaktera (Gärdenfors, 1986; Tomić et al., 2005). Molekularne studije nisu obuhvatale predstavnike sve tri grupe vrsta unutar podroda *Ephedrus*, sve do nedavne preliminarne analize Petrović et al. (2013), koja je

potvrdila ovu podelu. Potrebno je naglasiti da su neke od vrsta podroda *Ephedrus* bile klasifikovane unutar roda *Fovephedrus*, koga je opisao Chen (Chen, 1986). Rod je dobio ime na osnovu prisustva fovealne jamice na mezoskutumu, a u njega je kasnije klasifikovano još nekoliko vrsta roda *Ephedrus* kojima je zajednička karakteristika prisustvo fovee. Između ostalih, tu su bili klasifikovani *E. persicae* (kao *F. persicae*) i *E. lacertosus* (kao *F. lacertosus*). *Fovephedrus* je kasnije sinonimiziran sa rodnom *Ephedrus*, ali mu je dodeljen status podroda (van Achterberg, 1997). Međutim, opravdanost smeštanja vrsta u zaseban podrod isključivo na osnovu prisustva fovealne jamice, dovodi se u pitanje (Žikić et al., 2009).

Glavni morfološki taksonomski karakteri, koji dele podrod *Ephedrus* na tri grupe vrsta, su sledeći: dužina i oblik antena, broj mirisnih brazda na prvom i drugom flagelarnom segmentu, prisustvo fovealne jamice, odnos dužine nerava na prednjim krilima (3RS i 2RS), oblik i dužina pterostigme, oblik centralne areole propodeuma, broj seta na različitim delovima tela (klipeus, propodeum, legalica) i oblik petiolusa (Pennacchio et al., 1988).

Grupu vrsta *persicae* odlikuju: kratke antene sa brojem mirisnih brazda od nula do tri na prvom flagelarnom segmentu F1; prisustvo fovealne jamice; 2RS nerv obično duži od 3RS, vrlo retko jednakih dužina; centralna areola propodeuma pentagonalnog oblika, sa uočljivom subareolom; petiolus kratak i širok, gladak i bez brazda na posterolateralnom regionu (Pennacchio et al., 1988). Ovoj grupi pripadaju tri vrste: *Ephedrus persicae*, *Ephedrus chaitophori* i *Ephedrus lonicerae* (Žikić et al., 2009).

Generalne karakteristike grupe vrsta *plagiator* su sledeće: antene variraju u dužini od kratkih do srednje izduženih; prednja krila poseduju izraženu pterostigmu; 3RS nerv prednjih krila je duži ili jednak 2RS nervu; centralna areola je pentagonalnog oblika i prilično varijabilna; petiolus je manje-više izdužen, od 1,6 do 2 puta duži nego što je širok, sa brazdama u posterolateralnom regionu i izraženim dorzalnim grebenima. Ovoj grupi pripada najveći broj vrsta.



Grupi vrsta *lacertosus* odlikuju izdužene antene, kod kojih prvi flagelarni segment (F1) varira od srednje do izuzetno dugog. Pterostigma je vrlo dugačka i tanka, dok je 3RS nerv jednak ili duži od 2RS nerva. Petiolus je izdužen, bez izraženih tuberkula i sa slabo izraženim do potpuno odsutnim posterolateralnim brazdama (Pennacchio et al., 1988).

Pozicija roda *Ephedrus* unutar potfamilije Aphidiinae i dalje nije utvrđena. Postoji nekoliko hipoteza koji rod ili grupa je najsirodnija rodu *Ephedrus*. Na osnovu nervature krila i nekoliko drugih karakterata, rodovi *Toxares* i *Ephedrus* bili su klasifikovani zajedno u tribusu Ephedrini (Mackauer, 1968). Međutim, istraživanje larvalne morfologije ova dva roda je pokazalo da se oni znatno razlikuju (Finlayson, 1990). Takođe, ispitivanje morfologije larvi prvog stadijuma ukazalo je na veliku sličnost rodova *Ephedrus* i *Praon* (O'Donnell, 1989). Rod *Parephedrus* Starý & Carvel, 1971 iz Australije poseduje nekoliko karakterata koji su zajednički i vrstama roda *Ephedrus*, kao što su antene građene od 11 segmenata kod oba pola i slična nervatura krila. Zbog toga, pojedini autori smatraju da su ova dva roda blisko evolutivno povezana (Starý & Carver, 1971; Mackauer & Finlayson, 2012). Schlinger (1974) je rodove *Pseudephedrus* Starý, 1972 i *Parephedrus* klasifikovao unutar potfamilije Ephedrinae (sadašnjeg tribusa Ephedrini). Međutim, smatra se da ova dva arhaična roda, zajedno sa rodovima *Vanhartenia* Starý & van Harten, 1974 i *Choreopraon* Mackauer, 2012 formiraju odvojenu kladu ili klade u filogeniji potfamilije Aphidiinae.

Kada je reč o poziciji roda *Ephedrus* unutar potfamilije Aphidiinae, druga nedoumica je da li on predstavlja bazalnu grupu čitave potfamilije. Postoji nekoliko, uglavnom molekularnih studija čiji rezultati idu u prilog bazalnoj poziciji tribusa Praini (Smith et al., 1999), dok neki autori navode da je to *Aclitus* (Kambhampati et al., 2000) ili čak *Pseudephedrus* (Žikić et al., 2017). Pored navedenih, brojne molekularne i morfološke studije navode rod *Ephedrus* kao najverovatnijeg kandidata za bazalno mesto unutar potfamilije (Gärdenfors, 1986; Belshaw & Quicke, 1997; Sanchis et al., 2001; Shi & Chen, 2005).

Pored brojnih pleziomorfnih morfoloških karaktera (nervatura krila, broj članaka u antenama, postojanje centralne areole na propodeumu, oblik legalice itd.), fosilni nalazi dve vrste, *E. mirabilis* (33,9–23,03 miliona godina) iz oligocena i *E. primordialis* (48,6–40,4 miliona godina) (Starý 1973, Ortega-Blanco et al. 2009) iz eocena su jedinstveni za sve Aphidiinae i idu u prilog bazalnoj poziciji roda *Ephedrus*, mada je pitanje pozicije *E. primordialis* i dalje aktuelno (Ortega-Blanco, 2009).

Tabela 1. Lista evropskih vrsta roda *Ephedrus*

---

<i>Ephedrus blattnyi</i>	Starý, 1973
<i>Ephedrus brevis</i>	Stelfox, 1941
<i>Ephedrus cerasicola</i>	Starý, 1962
<i>Ephedrus chaitophori</i>	Gärdenfors, 1986
<i>Ephedrus dysaphidis</i>	Tomanović, Kavallieratos & Starý, 2005
<i>Ephedrus helleni</i>	Mackauer, 1968
<i>Ephedrus kopenhageni</i>	Halme, 1992
<i>Ephedrus lacertosus</i>	Haliday, 1833
<i>Ephedrus laevicollis</i>	Thomson, 1895
<i>Ephedrus longistigmus</i>	Gärdenfors, 1986
<i>Ephedrus lonicerae</i>	Tomanović, Kavallieratos & Starý, 2009
<i>Ephedrus nacheri</i>	Quilis Perez, 1934
<i>Ephedrus niger</i>	Gautier, Bonnamour & Gaumont, 1929
<i>Ephedrus persicae</i>	Froggatt, 1904
<i>Ephedrus plagiator</i>	Nees, 1811
<i>Ephedrus prociphili</i>	Starý, 1982
<i>Ephedrus vaccinii</i>	Gärdenfors, 1986
<i>Ephedrus validus</i>	Haliday, 1833

---

## CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Iz svega navedenog, može se zaključiti da do sada nije rađena nijedna molekularna i morfološka analiza fokusirana isključivo na rod *Ephedrus*. Postoji puno otežavajućih faktora kada se radi o taksonomiji i filogenetskim odnosima vrsta unutar ovog roda. Prvi problem je varijabilnost unutar vrsta, zbog koje su biotipovi iste vrste često opisivani kao nove vrste (Gärdenfors, 1986; Žikić et al., 2009). Drugi problem je postojanje velikih kompleksa, unutar kojih se nalaze kriptične vrste, koje nije jednostavno identifikovati isključivo na osnovu morfoloških karaktera.

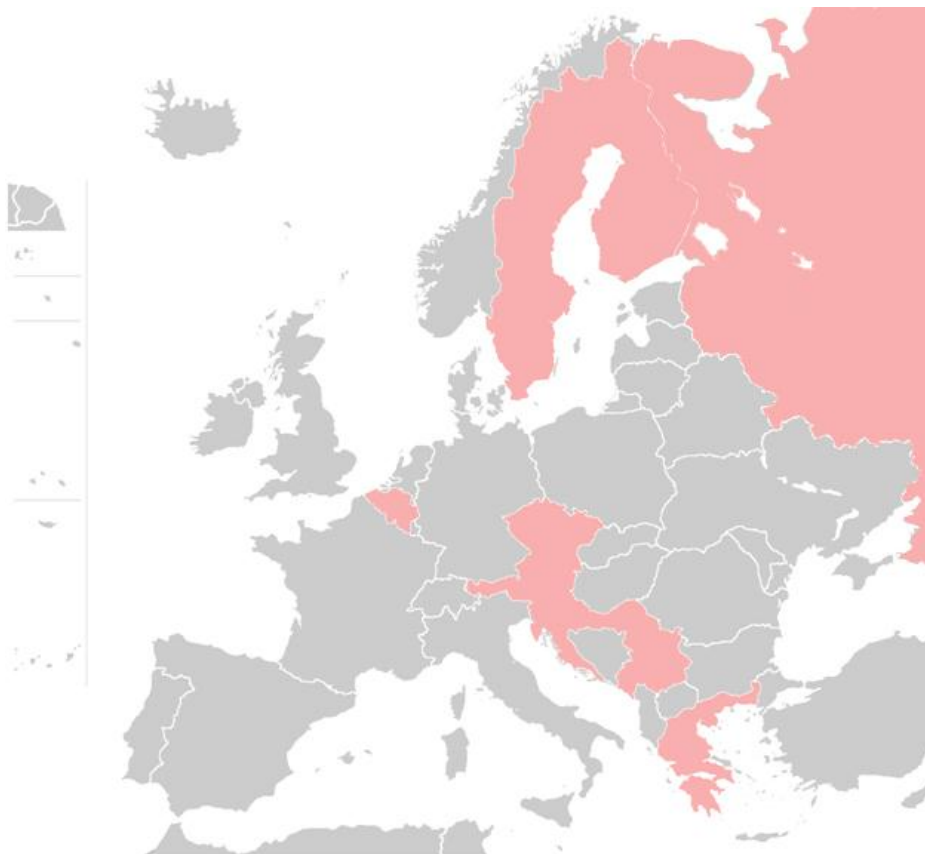
Osnovni ciljevi ove studije su sledeći:

1. Provera opravdanosti subgeneričke klasifikacije roda *Ephedrus* na tri podroda i ispitivanje filogenetskih odnosa između njih.
2. Ispitivanje taksonomskog statusa tri grupe vrsta podroda *Ephedrus*: *plagiator*, *persicae* i *lacertosus*.
3. Potvrđivanje statusa postojećih vrsta integrativno taksonomskim pristupom (kombinacijom molekularnih markera i morfometrije).
4. Utvrđivanje da li se unutar velikih kompleksa široko rasprostranjenih generalista (*E. plagiator* i *E. persicae*) kriju kriptične vrste.

## MATERIJAL I METODE

### SAKUPLJANJE UZORAKA

Jedinke korišćene u ovoj studiji sakupljene su u proteklih 30 godina širom Evrope (Slika 6). Uzorci su sakupljeni na dva načina, uz pomoć entomološke mreže ili sakupljanjem parazitiranih biljnih vaši. Drugi metod se smatra boljim, jer pruža važne podatke o trofičkim odnosima parazitoida, biljne vaši i biljke domaćina. Delovi biljke sa kolonijama biljnih vaši stavljeni su u plastične kutije koje poseduju otvore prekrivene mrežicom, radi ventilacije.



Slika 6. Evropske države iz kojih potiču sakupljeni uzorci.

Takvi uzorci su čuvani u laboratorijskim uslovima sve do izletanja odraslih jedinki, što može potrajati i nekoliko nedelja. Nakon izletanja iz mumija, parazitske ose su hvatane finom četkicom i prebacivane u tubicu sa 96% etanolom. Takođe, direktno na terenu su sakupljeni i uzorci biljnih vaši i biljaka, radi dalje identifikacije.

Od ukupno 18 vrsta rasprostranjenih u Evropi, za ovu studiju nisu bile dostupne tri: *E. lonicerae*, *E. longistigmus* i *E. vaccini*. Sve jedinke *E. lonicerae* su iskorišćene za pravljenje trajnih mikroskopskih preparata (Žikić et al., 2009), dok jedinke vrsta *E. longistigmus* i *E. vaccini* nije bilo moguće uzorkovati. Takođe, nekoliko vrsta je pozajmljeno ili dobijeno: po pet ženki *E. validus* i *E. koponeni* je pozajmljeno od Finskog Zoološkog Muzeja (Helsinki), devet jedinki *E. prociphili* je dobijeno iz kolekcije Petr Starý (Laboratory of Aphidology, Institute of Entomology, Academy of Sciences of the Czech Republic), a 15 jedinki *E. brevis* iz kolekcije Elene Davidian (Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, Russia). Morfološka analiza je podrazumevala disekciju jedinki i pravljenje mikroskopskih preparata. Jedinkama su prvo odstranjena krila, a nakon toga su potopljene u 10% kalijum–hidroksid (KOH) i kuvane od četiri do sedam minuta. Zatim je usledila disekcija koja je obavljena uz pomoć binokularne lupe ZEISS Discovery V8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Gottingen, Germany). Delovi tela su odvajani sledećim redom: antene, glava, mezoskutum, propodeum, petiolus i legalica. Disekovanu delovi su postavljeni u odgovarajući položaj u Berlezov rastvor, ostavljeni 24 sata i nakon toga fiksirani stavljanjem dodatne kapi Berlezovog medijuma i pokrovnog stakla. Svi mikroskopski preparati su slikani pod Leica DM LS mikroskopom (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), pri čemu je fotografisano nekoliko slika različitog fokusa, koje su obrađene u HeliconFocus 7 (Helicon Soft) programu. Merenje karaktera je urađeno u Image J softveru (Schneider et al. 2012). Morfološka terminologija prati studiju Sharkey & Wharton (1997). Kada je bilo dostupno više uzoraka, nekoliko jedinki svake vrste je fotografisano SEM metodom uz pomoć skening elektronskog mikroskopa Jeol JSM–6460LV (Jeol USA, Inc., Peabody, MA, USA).

## MOLEKULARNA ANALIZA

Ekstrakcija DNK je vršena iz pojedinačnih uzoraka uz pomoć Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) i Kapa Express Extract Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA), prateći protokol proizvođača. U oba slučaja je toraks jedinke prethodno probušen sterilnom entomološkom iglom, kako bi se omogućilo prodiranje tečnosti za ekstrakciju u unutrašnja tkiva, a samim tim i što veći prinos DNK. U zavisnosti od stanja uzorka, za amplifikaciju COI regiona (citohrom *c* oksidaza subjedinica I) korišćeni su različiti prajmeri. Za većinu uzoraka korišćeni su univerzalni prajmeri LCO1490 i HCO2198 (Folmer et al., 1994) (Tabela 2). U slučaju uzoraka kod kojih nije bilo moguće umnožiti DNK univerzalnim prajmerima usled fragmentacije DNK (suvi muzejski uzorci, jedinke čuvane u etanolu koje su starije od 10 godina), korišćeni su prajmeri za amplifikaciju kratkih fragmenata (Mitrović & Tomanović, 2018) (Tabela 3). Kratki fragmenti barkoding regiona COI gena su različite dužine i povezuju se u jednu jedinstvenu sekvencu pre poređenja sa drugim primercima. Jedarni faktor elongacije EF1 $\alpha$  je amplifikovan EFF i EFR prajmerima, preuzetim iz studije Belshaw i Quicke (1997) (Tabela 4). U slučaju LCO1490/HCO2198 i EFF/EFR prajmera, protokol je bio sledeći: finalna zapremina od 40  $\mu$ l sadržala je 2  $\mu$ l ekstrahovane DNK, 0,4  $\mu$ l Taq polimeraze, po 2  $\mu$ l prajmera (10 mM), 2,4  $\mu$ l dezoksinukleotidne smeše (0,6 mM), 3,6  $\mu$ l magnezijum hlorida (MgCl<sub>2</sub>), 4  $\mu$ l pufera i 23,6  $\mu$ l vode (H<sub>2</sub>O). U slučaju amplifikacije prajmerima za umnožavanje kratkih fragmenata, količina DNK je bila povećana na 4  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O smanjena na 21,6  $\mu$ l, dok je zapremina ostalih komponenti ostala ista kao i kod prethodnih amplifikacija. Sve PCR reakcije su vršene u Eppendorf mastercycler, a temperaturni profili za amplifikaciju uz pomoć sva tri para prajmera su prikazani na slikama (7–9).

Tabela 2. Univerzalni prajmeri korišćeni za amplifikaciju COI regiona (Folmer et al., 1994)

LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	COI
HCO2198	5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'	COI u 3'–5' smeru

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju kratkih fragmenata COI (Mitrović & Tomanović, 2018)

LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	COI
Pr2Rd	5'-GTTGWAATAAAATTAATWGCYCC-3'	COI u 3'-5' smeru
Aph3Fd	5'-CATTAGCWGGDATTTCYTC-3'	COI
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	COI u 3'-5' smeru

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju nuklearnog faktora elongacije EF1 $\alpha$  (Folmer et al., 1994)

EFF	5' -AGATGGGYAARGGTTTCCTTCAA- 3'	EF1 $\alpha$
EFR	5' -AACATGTTGTCDCCGTGCCATCC- 3'	EF1 $\alpha$

5' 95°C - inicijalna denaturacija  
 1' 94°C  
 1' 54°C  
 1'30'' 72°C  
 7' 72°C - finalna ekstenzija

} 35 ciklusa

Slika 7. Temperaturni profil za amplifikaciju COI regiona



5' 95°C - inicijalna denaturacija

1' 95°C }  
 1' 54°C } 37 ciklusa  
 30'' 72°C }

7' 72°C - finalna ekstenzija

Slika 8. Temperaturni profil za amplifikaciju kratkih fragmenata COI

5' 95°C - inicijalna denaturacija

30'' 94°C }  
 30'' 48°C } 40 ciklusa  
 1'30'' 72°C }

7' 72°C - finalna ekstenzija

Slika 9. Temperaturni profil za amplifikaciju EF1 $\alpha$  regiona

Uspešnost amplifikacija proverena je uz pomoć 1% agaroznog gela obojenog sa 2 $\mu$ l Midori Green (Nippon Genetics Europe). Neprečišćeni uzorci su poslani u kompaniju Macrogen Inc. koja je uslužno obavila prečišćavanje i sekvenciranje uzoraka (Seoul, Korea). U nekioliko slučajeva, PCR produkt je prečišćen uz pomoć QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Valencia, CA, USA) prateći protokol proizvođača.

Dobijene sekvence su proverene na prisustvo pseudogena, vizualizovane u programu FinchTv Geospiza Inc. (Seattle, USA) i ručno obrađene i poravnate u BioEdit programu

(Hall, 1999). Sve COI sekvence su skraćene na dužinu od 557 baznih parova, dok je maksimalna dužina sekvenci za EF1 $\alpha$  iznosila 440 bp. Dalje analize vršene su u MEGA 6 softveru (Tamura et al., 2013). Kimura dvoparametarski model bazne supstitucije (K2P) je korišćen pri izračunavanju prosečne genetičke distance između sekvenci. Bajesova analiza izvršena je u BEAST 2.5 programu (Drummond et al., 2012) po striktnom modelu sata i Julovom procesu specijacije. Inicijalni fajl dizajniran je u BEAUTI programu, pri čemu je korišćen Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993) sa Gama distribucijom koji je MEGA 6 program predložio kao najoptimalniji. Za *persicae* grupu vrsta, urađeno je i posebno filogenetsko stablo, metodama “maximum likelihood” (ML), “neighbor joining” (NJ) i “maximum parsimony” (MP). Za *out* grupu u svim slučajevima korišćena je vrsta *Venturia canescens* koja pripada sestrinskoj porodici Ichneumonidae. Dobijeni fajl insertovan je u FigTree1.4.3. program (Rambaut, 2009) koji je konstruisao filogenetska stabla za oba genska fragmenta.

## REZULTATI

### Molekularne analize

Navedenom molekularnom metodom uspešno je umnoženo i sekvencirano 80 sekvenci barkoding regiona COI gena. i to za vrste: *E. plagiator* (17), *E. persicae* (17), *E. niger* (7), *E. lacertosus* (5), *E. nacheri* (4), *E. helleni* (4), *Ephedrus* sp. n. 2 (4), *E. koponeni* (3), *E. prociphili* (3), *E. cerasicola* (3), *E. validus* (3), *Ephedrus* sp. n. 1 (2), *E. laevicollis* (2), *E. chaitophori* (1), *E. blatnyi* (1) i *E. brevis* (1) (Tabela 5.). Poređenjem dobijenih sekvenci, uključujući i šest referenci preuzetih iz banke gena, utvrđeno je 58 različitih COI

haplotipova. Dodatnih šest sekvenci preuzeto je iz banke gena, a ukupno je zabeleženo čak 58 različitih haplotipova.

Tabela 5. Analizirane jedinke koje su korišćene u rekonstrukciji filogenetskog stabla COI fragmenta. Jedinke preuzete iz banke gena u koloni sa prajmerima poseduju pristupni broj sekvence.

Vrsta	Sifra	Zemlja	Biljka	Biljna vaš domaćin	COI prajmeri
<i>E. plagiator</i>	Be15/73_1	Belgija	<i>Malus domestica</i>	<i>Rhopalosiphum insertum</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	Be15/73_2	Belgija	<i>Malus domestica</i>	<i>Rhopalosiphum insertum</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	S14/161	Slovenija	<i>Prenanthes purpurea</i>	<i>Macrosiphum prenanthidis</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	Ephe_Api	Crna Gora	<i>Heracleum</i> sp.	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	S14/186	Slovenija	<i>Ranunculus lanuginosus</i>	<i>Aphis fabae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	S10/50_2	Srbija	<i>Poaceae</i>	<i>Anoecia corni</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	S11/274	Crna Gora	<i>Tamarix</i> sp.	<i>Brachyunguis tamaricis</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	Be14/502_1	Belgija	<i>Poa annua</i>	<i>Sitobion avenae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	Be14/502_2	Belgija	<i>Poa annua</i>	<i>Sitobion avenae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	S11/469	Srbija	<i>Vicia cracca</i>	<i>Aphis craccae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. blattnyi</i>		Crna Gora	/	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	Be15/65	Belgija	<i>Prunus padus</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	A15/14	Austrija	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Sitobion avenae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	A15/09	Austrija	<i>Chenopodium album</i>	<i>Aphis fabae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>		Belgija	<i>Viridaxis</i>	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	S11/431	Srbija	<i>Abies alba</i>	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	SL09/63	Slovenija	<i>Triticum aestivum</i>	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. plagiator</i>	S14/180	Slovenija	<i>Galium</i> sp.	<i>Linosiphon galii</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. kaponeni</i>	EKP70	Finska	/	/	LCO1490/Pr2Rd, Aph3Fd/HCO2198
<i>E. kaponeni</i>	EKP	Finska	/	/	LCO1490/Pr2Rd, Aph3Fd/HCO2198
<i>E. kaponeni</i>	R18/09	Srbija	<i>Pinus peuce</i>	<i>Cinara</i> sp.	LCO1490/HCO2198
<i>E. prociphili</i>	E5	Češka	/	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. prociphili</i>	E6	Češka	/	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. prociphili</i>	E7	Češka	/	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. nacheri</i>	Be14/446	Belgija	<i>Senecio vulgaris</i>	<i>Brachycaudus cardui</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. nacheri</i>	Be15/429	Belgija	<i>Chenopodium album</i>	<i>Hayhurstia atriplicis</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. nacheri</i>	Be15/386	Belgija	<i>Chenopodium album</i>	<i>Hayhurstia atriplicis</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. nacheri</i>	Be15/354_2	Belgija	<i>Chenopodium album</i>	<i>Hayhurstia atriplicis</i>	LCO1490/HCO2198

<i>Ephedrus</i> sp. n.2	E_plag_hya	Crna Gora	<i>Lonicera xylosteum</i>	<i>Sanicula europaea</i>	LCO1490/Pr2Rd, Aph3Fd/HCO2198
<i>Ephedrus</i> sp. n.2	S11/750	Crna Gora	<i>Sanicula europaea</i>	<i>Hyadaphis foeniculi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>Ephedrus</i> sp. n.2	S11/750_2	Crna Gora	<i>Sanicula europaea</i>	<i>Hyadaphis foeniculi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>Ephedrus</i> sp. n.2	Hr15/43	Hrvatska	<i>Anthriscus sylvestris</i>	<i>Hyadaphis foeniculi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>Ephedrus niger</i>	S11/115	Srbija	<i>Latyrus</i>	<i>Megoura viciae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. niger</i>	S11/368	Srbija	<i>Centaurea</i> sp.	<i>Uroleucon jaceae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. niger</i>	Mn10/09	Crna Gora	<i>Cirsium</i> sp.	<i>Uroleucon</i> sp.	LCO1490/HCO2198
<i>E. niger</i>	S11/09	Srbija	<i>Artemisia</i> sp.	<i>Macrosiphoniella</i> sp.	LCO1490/HCO2198
<i>E. niger</i>	S110/12	Slovenija	<i>Limonium angustifolium</i>	<i>Staticobium limonii</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. niger</i>	S11/162_1	Srbija	<i>Chrysanthemum</i> sp.	<i>Macrosiphoniella sanborni</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. niger</i>	SRB/2014/ 039	Srbija	<i>Centaurea rhenana</i>	<i>Uroleucon jaceae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. laevicollis</i>	R16/23_1	Srbija	<i>Rosa canina</i>	<i>Chaetosiphon</i> sp.	LCO1490/HCO2198
<i>E. laevicollis</i>	R16/23_2	Srbija	<i>Rosa canina</i>	<i>Chaetosiphon</i> sp.	LCO1490/HCO2198
<i>E. cerasicola</i>	E_cerasi	Belgija	/	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. cerasicola</i>	Eph_Pyr	Srbija	<i>Pyrus communis</i>	<i>Dysaphis pyri</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. cerasicola</i>	Eph_Pyr	Srbija	<i>Pyrus communis</i>	<i>Dysaphis pyri</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. cerasicola</i>	E4_LCO	Srbija	<i>Ligustrum vulgare</i>	<i>Myzus ligustri</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. helleni</i>	Hr15/03	Hrvatska	<i>Salix amplexicaulis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	LCO1490/HCO2198
<i>E. helleni</i>	Hr15/7	Hrvatska	<i>Salix</i> sp.	<i>Cavariella aegopodii</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. helleni</i>	A15/15	Austrija	<i>Pastinaca hirsuta</i>	<i>Cavariella theobaldi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. helleni</i>	Hr15/68	Hrvatska	<i>Salix amplexicaulis</i>	<i>Cavariella aegopodii</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. validus</i>	EVL5	Finska	/	/	LCO1490/Pr2Rd, Aph3Fd/HCO2198
<i>E. validus</i>	EVL2	Finska	/	/	LCO1490/Pr2Rd, Aph3Fd/HCO2198
<i>E. validus</i>	EVL	Finska	/	/	LCO1490/Pr2Rd, Aph3Fd/HCO2198
<i>E. lacertosus</i>	Hr15/25	Hrvatska	<i>Rubus</i> sp.	<i>Amphorophora rubi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. lacertosus</i>	S12/818	Crna Gora	<i>Rubus hirsutum</i>	<i>Macrosiphum funestum</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. lacertosus</i>	S12/855	Crna Gora	<i>Rubus</i> sp.	<i>Macrosiphum funestum</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. lacertosus</i>	E9	Češka	/	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. lacertosus</i>	S12/851	Crna Gora	<i>Rubus</i> sp.	<i>Macrosiphum funestum</i>	LCO1490/HCO2198
<i>Ephedrus</i> sp. n. 1	E1 LCO	Slovenija	<i>Tamarix</i> sp.	<i>Brachyunguis tamaricis</i>	LCO1490/HCO2198
<i>Ephedrus</i> sp. n. 1	E2 LCO	Slovenija	<i>Tamarix</i> sp.	<i>Brachyunguis tamaricis</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. chaitophori</i>	SER EC	Srbija	<i>Populus nigra</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	S11/670	Crna Gora	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Aphis craccivora</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	S11/681_2	Crna Gora	<i>Parietaria</i> sp.	<i>Aphis parietariae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	S11/231	Crna Gora	<i>Parietaria</i> sp.	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	S11/662	Crna Gora	<i>Parietaria</i> sp.	<i>Aphis parietariae</i>	LCO1490/HCO2198

<i>E. persicae</i>	S11/218	Crna Gora	<i>Nerium oleander</i>	<i>Aphis nerii</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	Mn10/51	Crna Gora	<i>Punica granatum</i>	<i>Aphis punicae</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	S11/177	Srbija	<i>Prunus domestica</i>	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	S14/142	Švedska	<i>Malus domestica</i>	<i>Dysaphis plantaginea</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	Be15/28	Belgija	/	/	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	Epe 1	Srbija	<i>Malus domestica</i>	<i>Dysaphis plantaginea</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	Epe 2	Srbija	<i>Malus domestica</i>	<i>Dysaphis plantaginea</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	Be15/29	Belgija	<i>Prunus domestica</i>	<i>Brachycaudus helichrysi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	Be15/74	Belgija	<i>Prunus avium</i>	<i>Myzus cerasi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	Be14/3	Belgija	<i>Malus sp.</i>	<i>Dysaphis plantaginea</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	S14/139_1	Švedska	<i>Prunus tenella</i>	<i>Myzus cerasi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	S14/139_2	Švedska	<i>Prunus tenella</i>	<i>Myzus cerasi</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. persicae</i>	SRB006	Srbija	<i>Prunus domestica</i>	<i>Brachycaudus cardui</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. brevis</i>	S12/879	Rusija	/	<i>Svetlosna klopka</i>	LCO1490/HCO2198
<i>E. helleni</i>	KP983836	/	<i>Heracleum sp.</i>	<i>Cavariella sp.</i>	LCO1490puc/HCO2198 puc
<i>E. helleni</i>	JN620617	France	/	<i>Cavariella sp.</i>	LCO1490puc/HCO2198 puc
<i>E. lacertosus</i>	KR889551	/	/	/	LepF1/LepR1
<i>E. dysaphidis</i>	2804s13	Srbija	<i>Malus domestica</i>	<i>Dysaphis plantaginea</i>	LCO1490/HCO2198
<i>Venturia cansecens</i>	FJ478176	/	/	/	FJ478176

Status vrsta *E. brevis*, *E. cerasicola*, *E. laevicollis*, *E. koponeni*, *E. validus*, *E. prociphili* i *E. chaitophori* je po prvi put potvrđen kao validan putem COI regiona.

Filogenetsko stablo dobijeno na osnovu COI regiona, podelilo je sekvence u tri osnovne klade, međutim one nisu odgovarale tradicionalnoj podeli roda *Ephedrus* na tri podroda, *Breviephedrus*, *Lysephedrus* i *Ephedrus*. Prvu kladu formirale su vrste koje pripadaju *persicae* grupi vrsta (*E. persicae*, *E. chaitophori* i *Ephedrus* sp. n. 1). Druga klada je predstavljena vrstom *E. brevis*, dok su u treću grupisane sve ostale vrste (*plagiator* i *lacertosus* grupe vrsta) (Slika 7).

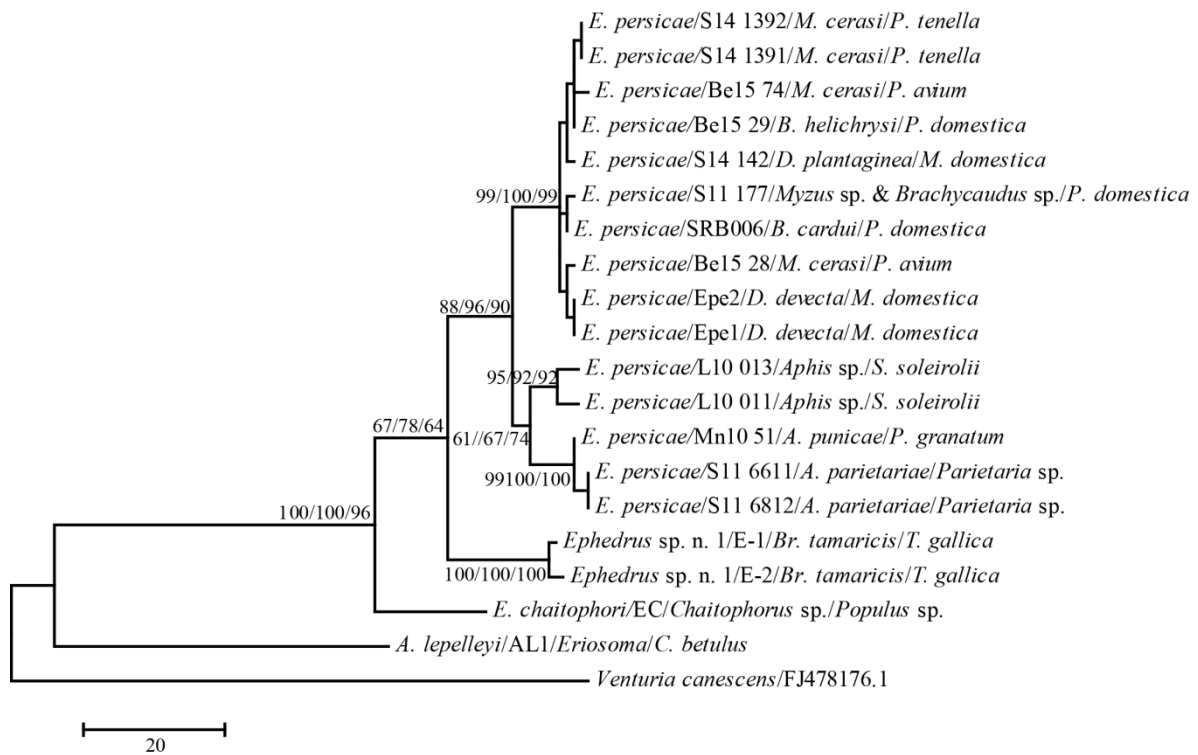
*Ephedrus brevis*, jedini predstavnik podroda *Breviephedrus*, na filogenetskom stablu se odvojio od *plagiator* grupe sa prosečnom genetičkom distancom od 16,3%, dok je

između ove vrste i *persicae* grupe ona iznosila 19,6%. Genetička distanca između *persicae* i *plagiator* klada iznosila je 20,7% (Tabela 6).

Unutar *persicae* grupe, jedinke su se odvojile u tri grupe (Slika 8). Prvoj liniji pripadala je vrsta *E. chaitophori*, drugoj *E. persicae*, dok su trećoj pripadale dve neidentifikovane jedinke označene kao *Ephedrus* sp. n. 1. Prosečna genetička distanca između *Ephedrus* sp. n. 1 i *E. chaitophori* iznosila je 6,4%, dok je između ove grupe i *E. persicae* vrste bila 5,7% (od 5,2% do 6,1%). U okviru *E. persicae*, jedinke su se grupisale u dve klade, sa prosečnom genetičkom distancom od 3,1%.



Slika 7. Filogenetsko stablo COI regiona, dobijeno Bajesovom metodom. Prikazane su kvantitativne podrške iznad 50%. Tradicionalna podela roda *Ephedrus* na podrodove prikazana je različitim bojom: *Lysephedrus* (plava), *Breviephedrus* (zelena) i *Ephedrus* (žuta). Broj sekvenci koje dele isti haplotip i zemlje iz kojih potiču prikazane su u zagradama. Skraćenice zemalja su sledeće: AT–Austrija, BE–Belgija, CZ–Češka, FI–Finska, HR–Hrvatska, ME–Crna Gora, RS–Srbija, RU–Rusija, SI–Slovenija.



Slika 8. Filogenetsko stablo COI regiona za *persicae* grupu vrsta. Dobijeno Maximum Likelihood (ML), Neighbour Joining (NJ) i Maximum Parsimony (MP) metodama. Topologija stabla za sve tri metode bila je ista, a kvantitativne podrške (MP/NJ/ML) su prikazane na granama.



Tabela 6. Matrica K2P genetičkih distanci između vrsta roda *Ephedrus* dobijene analizom sekvenci COI regiona

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	<i>Ephedrus</i> sp. n. 2																
2	<i>E. plagiator</i>	0.029															
3	<i>E. blattnyi</i>	0.030	0.003														
4	<i>E. niger</i>	0.058	0.046	0.046													
5	<i>E. cerasicola</i>	0.050	0.046	0.047	0.060												
6	<i>E. helleni</i>	0.080	0.085	0.086	0.083	0.085											
7	<i>E. brevis</i>	0.149	0.153	0.150	0.187	0.171	0.172										
8	<i>E. lacertosus</i>	0.106	0.094	0.092	0.108	0.091	0.092	0.176									
9	<i>E. validus</i>	0.085	0.087	0.084	0.090	0.082	0.075	0.163	0.084								
10	<i>E. koponeni</i>	0.045	0.036	0.035	0.068	0.061	0.105	0.159	0.115	0.092							
11	<i>E. prociphili</i>	0.048	0.032	0.030	0.064	0.057	0.100	0.154	0.113	0.089	0.024						
12	<i>E. laevicollis</i>	0.056	0.051	0.052	0.072	0.058	0.089	0.177	0.101	0.088	0.076	0.076					
13	<i>E. nacheri</i>	0.046	0.033	0.034	0.066	0.055	0.099	0.152	0.113	0.089	0.028	0.011	0.076				
14	<i>E. chaitophori</i>	0.202	0.194	0.190	0.211	0.202	0.209	0.197	0.198	0.187	0.195	0.193	0.234	0.195			
15	<i>E. persicae</i>	0.211	0.211	0.208	0.218	0.209	0.194	0.194	0.193	0.180	0.205	0.211	0.226	0.210	0.062		
16	<i>Ephedrus</i> sp. n. 1	0.220	0.209	0.206	0.216	0.220	0.230	0.215	0.205	0.206	0.211	0.213	0.240	0.221	0.056	0.060	
17	<i>E. dysaphidis</i>	0.046	0.042	0.043	0.055	0.005	0.080	0.168	0.087	0.077	0.056	0.052	0.052	0.051	0.197	0.205	0.215

*Ephedrus validus*, jedina vrsta unutar podroda *Lysephedrus* grupisala se unutar *plagiator* klade, gde se zajedno sa *E. helleni* odvajaju od ostalih vrsta iz *plagiator* grupe.

Sve ostale jedinke *plagiator* grupe, sa ukupno 10 vrsta, činile su drugu kladu (*E. plagiator*, *E. blattnyi*, *E. prociphili*, *E. nacheri*, *E. laevicollis*, *E. cerasicola*, *E. dysaphidis*, *Ephedrus* sp. n. 2, *E. niger* i *E. koponeni*). Jedna jedinka identifikovana kao *E. blattnyi* grupisala se zajedno sa vrstom *E. plagiator*, sa genetičkom distancom od 0,2% do 0,7% između nje i ostalih *E. plagiator* sekvenci. Isti slučaj bio je i sa vrstom *E. dysaphidis* kod koje se genetička distanca kretala od 0,0% do 1,6 % u poređenju sa vrstom *E. cerasicola*. Četiri jedinke označene kao *Ephedrus* sp. n. 2 formirale su zasebnu kladu unutar *plagiator* grupe, pri čemu su bile najbliže vrsti *E. plagiator*, sa genetičkom distancom od 2,7% do 3,1%.

Unutar *plagiator* grupe, genetičke distance između vrsta varirale su značajno, od 1,1% između *E. nacheri* i *E. prociphili*, pa sve do 7,6% između *E. laevicollis* i dve navedene vrste.

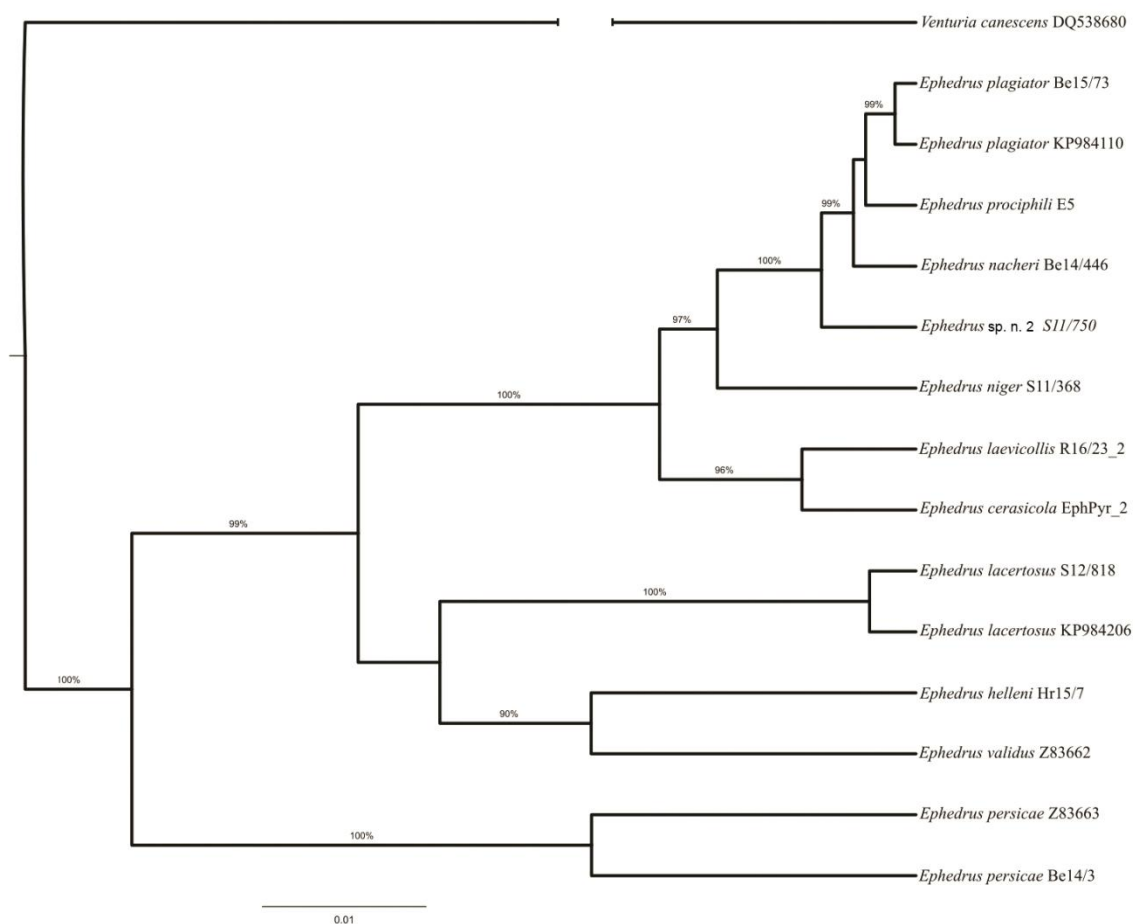
*Ephedrus lacertosus* se odvojio kao zasebna klada, sa genetičkom distancom većom od 8,9% u odnosu na ostale vrste podroda *Ephedrus*.

Jedarnim faktorom elongacije EF1 $\alpha$ , analizirano je ukupno 14 sekvenci (četiri je preuzeto iz banke gena), koje su predstavljale 11 vrsta (*E. persicae*, *E. plagiator*, *E. niger*, *E. validus*, *E. prociphili*, *E. nacheri*, *Ephedrus* sp. n. 2, *E. cerasicola*, *E. laevicollis*, *E. helleni*, *E. lacertosus*) (Tabela 7). Kao što je bilo i očekivano, s obzirom da se radi o jedarnom genu koji je u većoj meri konzervativan u odnosu na mitohondrijski COI region, genetičke distance između vrsta bile su značajno niže, ali je topografija filogenetskog stabla ostala slična kao i pri analizi COI regiona (Slika 9). Kao i na prethodnom filogenetskom stablu, sekvence su se razdvojile na dve klade, gde je prvoj pripadao jedini predstavnik *persicae* grupe vrsta, *E. persicae*, dok su drugu kladu činili predstavnici *lacertosus* i *plagiator* grupa vrsta. Usled slabog prinosa DNK, ovaj fragment nije bilo moguće amplifikovati kod uzoraka vrste *E. brevis*. Jedina značajna razlika na EF1 $\alpha$  filogenetskom stablu u odnosu na COI predstavlja pozicija vrsta *E. helleni* i *E. validus*. Umesto sa *plagiator* grupom, one se na stablu grupišu sa jedinkama *E. lacertosus*. Ovakva topografija

može biti rezultat genetičkih distanci: u odnosu na *plagiator* grupu vrsta, te distance se kreću od 3,8%–7,2%, dok je u odnosu na *E. lacertosus* raspon distanci niži i kreće se od 4,2% do 5,4%. Prosečne genetičke distance između *E. persicae* i druge dve, *plagiator* i *lacertosus* grupe, iznosile su 7,6% i 9,0% (Tabela 8).

Tabela 7. Analizirane jedinke koje su korišćene u rekonstrukciji filogenetskog stabla EF1 $\alpha$  fragmenta. Jedinke preuzete iz banke gena u koloni sa prajmerima poseduju pristupni broj sekvence.

Vrsta	Šifra	Zemlja	Biljka	Biljna vaš	COI/EF1 $\alpha$ prajmeri
<i>E. plagiator</i>	Be15/73_1	Belgija	<i>Malus domestica</i>	<i>Rhopalosiphum insertum</i>	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>E. prociphili</i>	E5	Češka	/	/	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>E.nacheri</i>	Be14/446	Belgija	<i>Senecio vulgaris</i>	<i>Brachycaudus cardui</i>	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>Ephedrus</i> sp. n. 2	S11/750	Crna Gora	<i>Sanicula europaea</i>	<i>Hyadaphis foeniculi</i>	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>E. niger</i>	S11/368	Srbija	<i>Centaurea</i> sp.	<i>Uroleucon jaceae</i>	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>E. laevicollis</i>	R16/23_2	Srbija	<i>Rosa canina</i>	<i>Chaetosiphon</i> sp.	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>E. cerasicola</i>	Eph_Pyr	Srbija	<i>Pyrus communis</i>	<i>Dysaphis pyri</i>	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>E. helleni</i>	Hr15/7	Hrvatska	<i>Salix</i> sp.	<i>Cavariella aegopodii</i>	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>E.lacertosus</i>	S12/818	Crna Gora	<i>Rubus hirsutum</i>	<i>Macrosiphum funestum</i>	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>E. persicae</i>	Be14/3	Belgija	<i>Malus</i> sp.	<i>Dysaphis plantaginea</i>	EFF/EFR Belshaw and Quicke 1997
<i>E. validus</i>	Z83662	/	/	/	EFF/EFR
<i>E. lacertosus</i>	KP984206	/	/	/	EFF/EFR
<i>E. persicae</i>	Z83663	/	/	/	EFF/EFR
<i>E. plagiator</i>	KP984110	/	/	/	EFF/EFR
<i>V. cansecens</i>					



Slika 9. Filogenetsko stablo *Ephedrus* vrsta dobijeno na osnovu jedarnog EF1 $\alpha$  regiona i Bajesovom metodom. Prikazane su kvantitativne podrške veće od 50%.

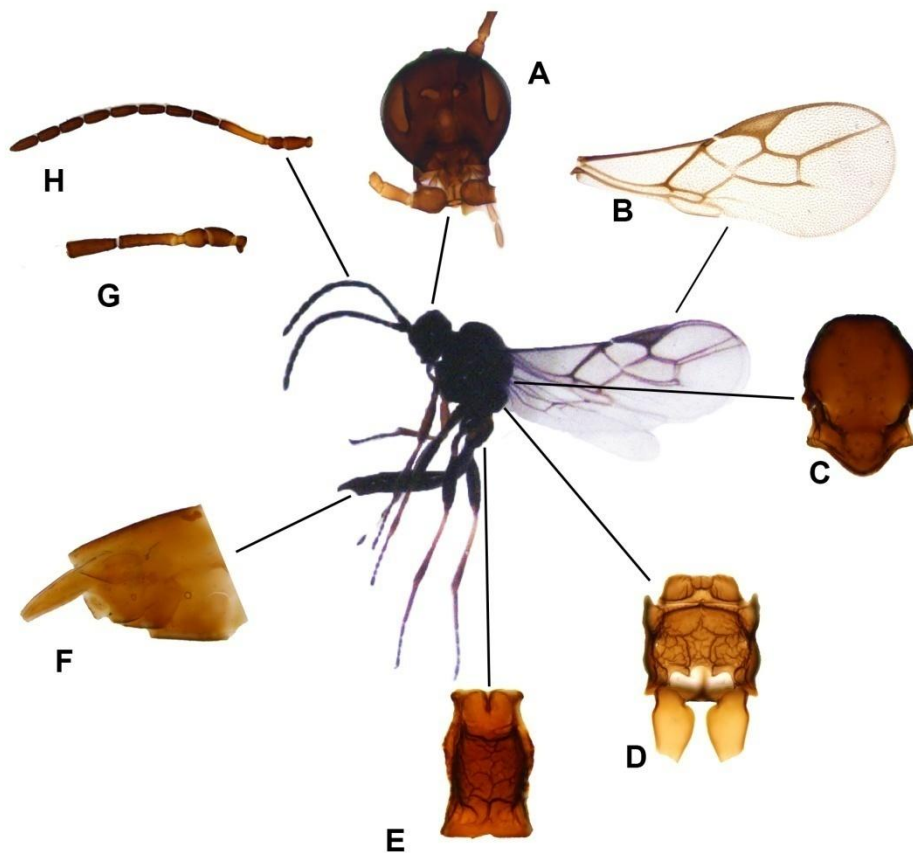
Molekularna analiza COI regiona, grupisala je sa značajnom genetičkom distancom uzorke obeležene kao *Ephedrus* sp. n. 1 i *Ephedrus* sp. n. 2 u zasebne klade, odvojene od ostalih vrsta. Ovakva pozicija *Ephedrus* sp. n. 2 na filogenetskom stablu je potvrđena i analizom EF1 $\alpha$ . Međutim, to nije bilo moguće za *Ephedrus* sp. n. 1 usled neuspešne amplifikacije DNK.

Tabela 8. K2P genetičke distance *Ephedrus* uzoraka dobijene na osnovu analize jedarnog EF1 $\alpha$  regiona.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>E. lacertosus</i> KP984206													
2	<i>E. plagiator</i> KP984110	0.067												
3	<i>E. validus</i> Z83662	0.054	0.080											
4	<i>E. persicae</i> Z83663	0.083	0.096	0.075										
5	<i>E. niger</i> S11_368	0.062	0.030	0.067	0.093									
6	<i>E. helleni</i> Hr15_7	0.042	0.062	0.037	0.067	0.050								
7	<i>Ephedrus</i> sp. n. 2 S11_750	0.065	0.011	0.083	0.099	0.028	0.065							
8	<i>E. lacertosus</i> S12_818	0.005	0.064	0.054	0.080	0.060	0.042	0.062						
9	<i>E. plagiator</i> Be15_73_1	0.070	0.002	0.082	0.099	0.033	0.065	0.014	0.067					
10	<i>E. laevicollis</i> R16_23_2	0.057	0.030	0.065	0.088	0.018	0.045	0.028	0.055	0.033				
11	<i>E. persicae</i> Be14_3	0.070	0.090	0.088	0.040	0.088	0.075	0.093	0.072	0.093	0.088			
12	<i>E. prociphili</i> E5	0.075	0.007	0.088	0.104	0.033	0.070	0.014	0.072	0.009	0.038	0.098		
13	<i>E. cerasicola</i> Eph_pyr_2	0.050	0.028	0.057	0.080	0.011	0.038	0.030	0.047	0.030	0.007	0.080	0.035	
14	<i>E. nacheri</i> Be14_446	0.077	0.009	0.090	0.107	0.035	0.072	0.016	0.075	0.011	0.040	0.101	0.011	0.037

## MORFOLOŠKA ANALIZA

Izmerena su ukupno 22 morfološka karaktera (Slika 10), od kojih su tri pripadala merističkom tipu (broj mirisnih brazdi na prvom i drugom flagelarnom segmentu, prisustvo dve, jedne ili potpuno odsustvo fovealne jamice), a ostatak kontinuiranom (Tabela 9).



Slika 10. Glavni karakteri koji variraju kod roda *Ephedrus*: A–glava, B–prednje krilo, C–mezoskutum, D–propodeum, E–petiolus, F–legalice, G–prvi i drugi flagelarni segment, H–antena

Tabela 9. Analizirani morfološki karakteri.

Dužina prvog flagelarnog segmenta	F1 l
Širina prvog flagelarnog segmenta	F1 w
Dužina drugog flagelarnog segmenta	F2 l
Širina drugog flagelarnog segmenta	F2 w
Broj mirisnih brazda na prvom flagelarnom segmentu	F1 Rin
Broj mirisnih brazda na drugom flagelarnom segmentu	F2 Rin
Tentori-okularno rastojanje	f
Inter-tentorijalno rastojanje	i
Dužina malarnog prostora	ms
Uzdužni dijametar oka	e
Dužina pterostigme	pt l
Širina pterostigme	pt w
r uzdužni nerv	r
r-m uzdužni nerv	r-m
3RSa nerv	3RSa
2RSa nerv	2RSa
3RSb nerv	3RSb
Dužina petiolusa	pe l
Širina petiolusa u novou spirakuluma	pe w
Dužina legalice	ovi l
Širina legalice	ovi w
Prisustvo fovealne jamice	Fovea

Kod roda *Ephedrus*, broj antenalnih članaka, labijalnih i maksimalnih palpomera je konstantan, bez obzira na vrstu i pol. Karakteri koji su najviše varirali bili su odnos dužine 3RS i 2RS nerava na krilima, odnos dužine i širine petiolusa, odnos dužine i širine prvog flagelarnog segmenta F1 (Tabela 10). Kod *persicae* grupe vrsta 3RS nerv je kraći od 2RS, dok je kod *plagiator* grupe on u manjoj ili većoj meri duži od 2RS, a kod vrsta *E. brevis* i *E. validus* značajno dug.

Odnos dužine i širine petiolusa takođe varira između podrodova, a može se kretati od skoro kvadratnog (*E. brevis*), preko *persicae* grupe gde je zdepast i kratak, pa do izduženog, kao što je to slučaj kod vrsta iz *plagiator* i *lacertosus* grupe. Odnos dužine i širine prvog flagelarnog segmenta (F1) može biti prilično informativan karakter pri identifikaciji vrsta, a varira od prilično kratkog kod *E. nacheri* (3,0–3,7), pa do izuzetno izduženog F1, kao što je to slučaj kod *E. lacertosus* gde se odnos dužine i širine kreće od 6,0 do 6,80. Takođe, broj mirisnih brazdi na prvom i drugom flagelarnom segmentu varira između grupa vrsta i vrsta (na F1 *persicae* grupa vrsta poseduje mali broj mirisnih brazdi, dok *plagiator* poseduje skoro duplo više). Odnos dužine i širine pterostigme predstavlja bitan karakter pri identifikaciji vrsta kod drugih rodova potfamilije Aphidiinae, a kod vrsta roda *Ephedrus* to variranje takođe ispoljava određenu pravilnost, mada ne u tolikoj meri. Malarni i tentorijalni indeksi su se ispostavili kao neinformativni karakteri, s obzirom na mala variranja između vrsta. Iako su postojale razlike u dužini i širini legalice, nije uočena nikakva pravilnost, a nije bila ni moguća identifikacija vrste samo na osnovu ovih mera, s obzirom da su se dobijene vrednosti u velikom stepenu preklapale. Takođe, morfološka studija dodatno uključuje i deskripciju oblika i boje određenih delova tela i struktura. Na primer, jedinke vrste *E. niger* poseduju suženje u prvoj trećini F1 segmenta, *E. brevis* jedinke imaju mezoskutelnaru fosetu podeljenu na dva dela i karakteristično obojen propodeum.



Tabela 10. Odnosi mera evropskih *Ephedrus* vrsta.

VRSTA	F1 l/w	F2 l/w	F1/F2 I	F1 Rin	F2 Rin	head f/i	head ms/e	pt l/w	ptw/r	3Rsa/r-m	3Rsa/2RSa	3RSb/3RSa	petiole l/w	ovipositor l/w
<i>Ephedrus brevis</i>	4.5-5.2	3.2-3.5	1.29-1.36	0	2-4	0.4-0.46	0.19-0.24	4.7-5.0	1.7-2.3	2.3-2.4	1.6-1.8	1.3-1.4	1.2-1.3	2.82
<i>Ephedrus helleni</i>	3.1-3.6	2.2-2.8	1.1-1.29	0-2	1-3	0.50-0.73	0.33-0.39	4.3-4.5	1.4-2.0	1.6-2.0	1.1-1.3	1.8-2.2	1.8-2.0	2.8-3.7
<i>Ephedrus kaponeni</i>	4.1-4.6	3.3-3.8	1.06-1.20	0-1	0-1	0.57	0.36	4.2-4.4	1.6-1.8	1.8-2.0	1.3-1.5	1.7-1.9	1.9	
<i>Ephedrus lacertosus</i>	6.0-6.8	4.2-4.7	1.34-1.60	0-3	2-4	0.48-0.72	0.42-0.51	5.6-5.8	0.8-1.0	1.5-1.7	1.0-1.2	2.0-2.1	1.9-2.5	4.0-4.7
<i>Ephedrus laevicollis</i>	3.2-3.6	2.3-2.7	1.08-1.37	0-1 (2)	0-3			4.0-4.5	1.6-1.2	1.6-2.3	1.2-1.4	1.7-2.1	1.5-1.8	3.0-3.5
<i>Ephedrus nacheri</i>	3.0-3.7	3.0-3.2	1.05-1.09	1-2	2-4	0.5-0.79	0.34-0.4	4.0-4.5	1.4-1.8	1.7-2.3	1.1-1.4	1.8-2.0	1.9-2.2	2.7-3.4
<i>Ephedrus niger</i>	4.1-4.6	3.1-3.6	1.08-1.36	2-5	3-5 (7)	0.64-0.75	0.4-0.43	3.3-4.0	1.6-2.5	1.4-1.8	1.0-1.1	2.0-2.6	2.4	3.4-4.4
<i>Ephedrus persicae</i>	3.4-4.9	2.2-3.4	1.13-1.62	0-4	1-4	0.34-0.62	0.29-0.45	4.4-5.5	1.0-1.5	1.1-1.6	0.6-0.98	2.6-3.3	1.1-1.5	2.7-3.2
<i>Ephedrus plagiator</i>	3.2-4.3	2.7-3.6	1.12-1.24	3-5	3-6	0.39-0.57	0.25-0.34	4.3-4.7	1.5-1.9	1.6-2.0	1.2-1.3	1.7-1.9	2.0-2.2	3.0-4.1
<i>Ephedrus prociphili</i>	3.4-3.5	3.2-3.3	1.08-1.10			0.53	0.39							
<i>Ephedrus validus</i>	4.5-4.8	2.4-3.0	1.51-1.65	1-2	3-4	0.91	0.48	4.0-5.1	0.9-1.5	1.8-2.2	1.1-1.3	1.8-2.0	1.5-1.7	2.2-2.6
<i>Ephedrus loniceræ</i>	4.5-5.5	2.9-3.4	1.3-1.48	0-1	1-3	0.5	0.3-0.4	5.9-6.2	0.9-1.0	1.2-1.3	0.6-0.8	3.1-3.3	1.4-1.6	3.0-3.5
<i>Ephedrus chaitophori</i>				1	1	0.5	0.2						1.51	
<i>Ephedrus cerasicola</i>	3.7-5.2	2.5-3.3	1.2-1.4	0-1	0-3	0.5-0.6	0.3-0.4	4.0-4.5	1.4-1.7	1.6-2.3	1.1-1.4	1.9-2.1	1.9-2.1	2.7-3.2

## OPIS DVE NOVE VRSTE

Morfološko ispitivanje otkrilo je niz karaktera koji izdvajaju jedinke označene kao *Ephedrus* sp. n. 1 odgajenih sa *Brahyunguis tamaricis* i *Ephedrus* sp. n. 2 odgajenih sa *Hyadaphis foeniculi*, u odnosu na ostale vrste, pri čemu je potvrđen rezultat filogenetske analize. Kao posledica toga, opisane su dve nove vrste, *Ephedrus tamaricis* sp. n. (*Ephedrus* sp. n. 1) i *Ephedrus hyadaphidis* sp. n. (*Ephedrus* sp. n. 2).

*Ephedrus tamaricis* sp. n. Petrović & Tomanović

Ova vrsta pripada *persicae* grupi, s obzirom na kratak 3RSa nerv prednjih krila i kratak i zdepast petiolus. Razlikuje se od ostalih vrsta ove grupe po sledećim karakteristikama: antene su jasno zadebljale u vršnom delu, dok su filiformne kod *E. persicae*, *E. chaitophori* i *E. lonicerae*, F2 je skoro jednak po dužini F1 ( $F1/F2 = 1,23-1,30$ ), a F1 poseduje žuti prsten u osnovi (dok je kod *E. chaitophori* ceo F1 žut, kod *E. lonicerae* ceo F1 i prva polovina F2, a kod *E. persicae* svetlo braon do braon). *Ephedrus tamaricis* je specijalizovani parazitoid biljne vaši *Brachyunguis tamaricis* sa biljke *Tamarix gallica*.

Ženka

*Glava* (Slika 11–A). Odnos malarnog prostora i uzdužnog dijametra oka varira od 0,28 do 0,32, a tentorijalni indeks iznosi 0.43-0.52. Klipeus je ovalan sa 10 dugačkih seta. Maksilarni palpisi su građeni od četiri, a labijalni od dve palpomere. Antene poseduju 11 segmenata i zadebljale su u vršnom delu (Slika 11–B). Flagelarni segmenti F1 (4,5–4,9) i F2 (2,7–3,1) su izduženi (Slika 11–C). Kod F1 broj mirisnih brazdi može biti 0 ili 1 i ovaj segment je za 1,23–1,30 puta duži od F2, koji na sebi ima jednu mirisnu brazdu.

*Mezozoma*. Mezoskutum poseduje brazde (*notauli*) vidljive samo u prvoj polovini, sa setama distribuiranim u dva reda (Slika 11–D). Na mezoskutumu se nalazi jedna fovealna jamica. Propodeum je sa centralnom pentagonalnom areolom (Slika 11–E), pri čemu gornje bočne areole imaju na sebi 2–4 sete, a donje bočne 1–2.

*Krila*. Odnos dužine i širine pterostigma je 5,05–5,22. Odnos nerava 3RSa/2RS je 0,73–0,89, a 3RSb/3RSa 2,52–2,76 (Slika 11–F). Telo je skoro jednako dužini krila (1,1 put duže nego krilo).

*Metazoma*. Petiolus je skoro kvadratičnog oblika, 1.27–1.43 puta duži nego što je širi (Slika 11–G). Legalice je izdužena (odnosa dužine i širine 2,9–3,3), sa četiri do šest seta duž dorzalne strane i sa dve do četiri sete duž ventralne (Slika 11–H).

*Obojenost*. Glava je tamno braon. Skapus i pedicel su braon. Prvi flagelarni segment poseduje u osnovi žuti prsten, dok je ostatak antene braon. Usni delovi variraju od žute do braon boje. Petiolus je svetlo braon, kao i noge. Metazoma i ostali delovi tela su braon.

Dužina tela je 1.4 mm.

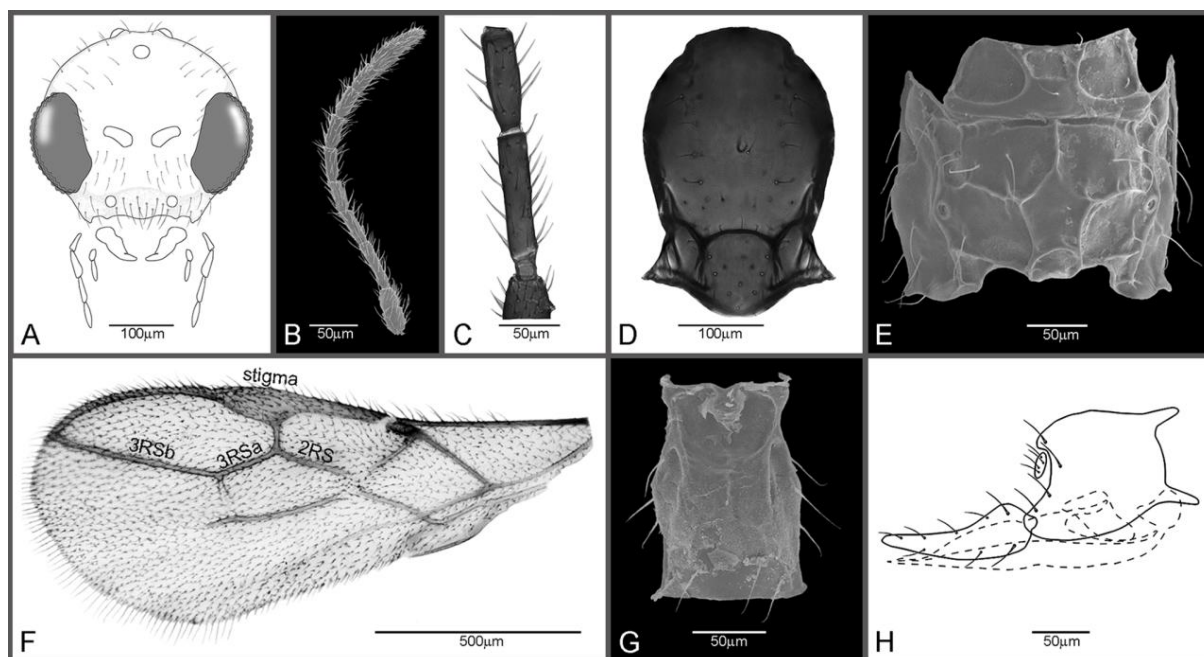
*Mušjak*. Antene imaju 11 segmenata, srednje su debljine u vršnom delu. Boja usnih delova varira od žute do braon, noge su svetlo braon. Prvi flagelarni segment takođe poseduje žut prsten u osnovi segmenta, dok je ostatak antene braon. Petiolus i ostatak tela su braon.

**Materijal**. Holotip: 1 ♀, Slovenija, Izola: sa *Brachyunguis tamaricis* na *Tamarix gallica*. Od holotipa je napravljen mikroskopski preparat. Paratipovi: 6 ♀, 5 ♂, Slovenija, Izola: sa *B. tamaricis* na *T. gallica*. Od jedne ♀ i jednog ♂ su napravljeni mikroskopski preparati, a ostatak jedinki je čuvan u alkoholu.

*Etimologija*. Ime ove vrste potiče od biljne vaši domaćina.

*Distribucija*. Trenutna poznata distribucija obuhvata slovenačko primorje.

*Domaćin*. *Brachyunguis tamaricis* u asocijaciji sa *Tamarix gallica*.



Slika 11. *Ephedrus tamaricis*. A–Glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–prednje krilo sa označenim nervima čija je dužina merena, G–petiolus, H–legalica.

*Ephedrus hyadaphidis* sp. n. Kocić & Tomanović

Dijagnoza. Usled dužeg 3RSa nerva od 2RSa, ova vrsta pripada *plagiator* grupi. Razlikuje se od ostalih vrsta roda *Ephedrus* po kratkom prvom flagelarnom segmentu, čiji odnos dužine i širine varira od 2,40 do 2,65 (sledeći je *E. nacheri*, kod koga je odnos dužina/širina 3,05–3,7). Najrodnija i morfološki najsljednija je sa vrstom *E. plagiator*. Osim kratkog F1, od nje se još razlikuje po manjem broju mirisnih brazda na F2 (poseduje 2–3 brazde, dok *E. plagiator* ima 4–6). *Ephedrus hyadaphidis* je specijalizovani parazitoid biljne vaši *Hyadaphis foeniculi*, rasprostranjen na Balkanskom poluostrvu.

## Ženka

*Glava* (Slika 12–A). Oči su srednje veličine, ovalne, naglašene i sa nekoliko seta. Klipeus je umereno konveksan, a na njemu se nalazi osam dugih dlaka. Tentorijalni indeks iznosi 0,6–0,7, a tentorijalne jamice su duboke. Odnos malarnog prostora i longitudinalnog dijametra oka je 0,4. Maksilarni palpisi imaju četiri segmenta, labijalni dva, a sva četiri poseduju na svojoj površini guste dlačice. Filiformne antene imaju 11 segmenata (Slika 12–B). Prvi flagelarni segment poseduje dve do tri mirisne brazde, a odnos dužine i širine iznosi 2,41–2,67. Drugi flagelarni segment je 2,31–2,65 puta duži nego širi, sa takođe dve do tri mirisne brazde (Slika 12–C). Broj ovih brazdi na ostalim flagelarnim segmentima ostaje nizak u poređenju sa drugim vrstama (F3 2–4, F4 2–4, F5 3–5, F6 3–6, F7 4–6, F8 4–6, F9 4–6). Flagelarni segmenti F8 i F9 su razdvojeni, ali usled velikog broja gustih seta u vršnom delu to nije jasno uočljivo.

*Mezozoma*. Mezoskutum poseduje slabo naborane brazde (notaule) koje su vidljive samo u prednjem delu. Duž mezoskutuma su prisutna dva reda retkih dlaka (Slika 12–D). Propodeum poseduje areole sa jasnim grebenima i centralnom areolom pentagonalnog oblika (Slika 12–E). Donje i gornje bočne areole imaju od dve do četiri sete.

*Krila*. Dužina krila iznosi 1,6 mm, širina 0,6 mm. Odnos dužine i širine pterostigme iznosi 4,15–4,35. Odnos širine pterostigme i dužine r nerva iznosi 1.62–1.87. Odnos dužina 3RSa/r-m nerava je 1,62–1,70, a 3RSb/3RSa 1,97–2,14. Nerv 2RSa je slabo vidljiv u bazalnom delu, te stoga može izgledati kraće nego što zapravo jeste. Odnos dužina nerava 3RSa i 2RSa iznosi 1,1–1,2 (Slika 12–H).

*Metazoma*. Petiolus je izdužen, 2,05–2,15 puta duži nego što je širi u nivou spirakuluma. Centralni greben petiolusa je izražen, dok su bočni dorzalni grebeni slabo vidljivi. Posteriorna bočna udubljenja na petiolusu su prisutna (Slika 12–F). Legalica je izdužena sa retkim dlakama na površini, a odnos njene dužine i širine iznosi 3,3 (Slika 12–G).

*Obojenost*. Glava i mezoskutum su braon, ostatak mezozome i petiolus su žuto–braon. Usni delovi su braon. Skapus i pedicel su braon, prvi flagelarni segment poseduje žuti prsten u osnovi, a ostatak antene je braon. Metazoma i legalica su braon. Noge su žućkaste boje.

Dužina tela iznosi 1,8 mm.

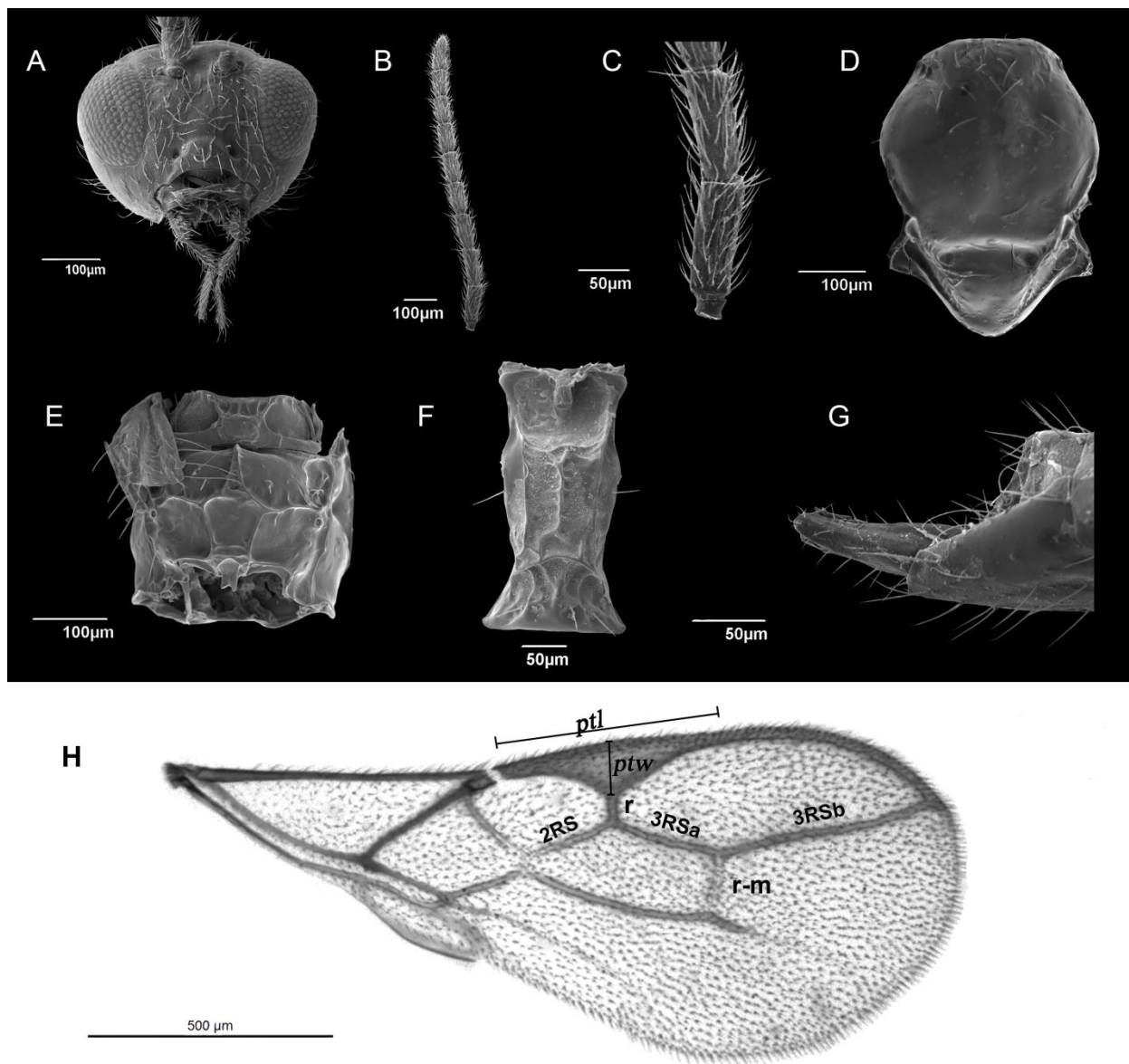
Mužjak. Oči su nešto izraženije nego kod ženke. Na glavi se nalaze pojedinačne dlačice. Tentorijalni indeks je 0,45, dok je odnos malarnog prostora i uzdužnog dijametra oka 0,3. Odnos dužine i širine prvog i drugog flagelarnog segmenta iznosi 2,45, a na oba segmenta su prisutne dve do tri uzdužne mirisne brazde. Maksilarni palpusi imaju četiri palpomere, labijalni dve. Mezoskutum je isti kao kod ženke. Propodeum ima pentagonalnu centralnu areolu i formirane jednake grebene. Pterostigma je malo šira nego kod ženke (odnos dužine i širine iznosi 3,8–3,9). 3RSa/2RSa odnos je 1,3–1,4. Petiolus je duplo duži nego što je širok u nivou spirakuluma. Boja je ista kao i kod ženke.

**Materijal.** Holotip. 1♀ Crna Gora, Durmitor-Sušica, 27.07.2012. sa *Hyadaphis foeniculi* na *Sanicula europaea*. Paratipovi: 2♂ Crna gora: Durmitor–Sušica, 27.07.2012, sa *H. foeniculi* na *S. europaea*. 3♀6♂ Crna Gora: Crno jezero, 20.06.2004, sa *H. foeniculi* na *Lonicera xylosteum*. 5♂ Crna Gora: Durmitor–Sušica, 22.07.2004, sa *H. foeniculi* na *S. europaea*. 5♀9♂ Hrvatska: Plitvička jezera–Milanovac, 20.06.2015, sa *H. foeniculi* na *Anthriscus sylvestris*.

*Etimologija.* Ime potiče od biljne vaši domaćina, *Hyadaphis foeniculi*.

*Distribucija.* Trenutna distribucija vrste je Balkansko poluostrvo.

*Domaćin.* *Hyadaphis foeniculi*.



Slika 12. *Ephedrus hyadaphidis* sp. n., ženka. A–glava, B–antena C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo sa obeleženim karakterima koji su izmereni. ptw i ptl predstavljaju dužinu i širinu pterostigme.

## SINONIMIZACIJA

Na filogenetskom stablu, jedinka koja je identifikovana kao *E. dysaphidis* grupisala se zajedno sa vrstom *E. cerasicola*, sa genetičkom distancom koja se kretala od 0% do 1,6%. Nakon ovakvog rezultata, obavljene su detaljne morfološke analize sa ciljem da se ustanovi status ove dve vrste.

Vrsta *Ephedrus dysaphidis* je prvi put opisana u studiji Tomić et al. (2005). Ova vrsta pripada *plagiator* grupi, a razlikuje se od ostalih po broju mirisnih brazdi na F1 (1–2, retko 3) i F2 (2–3, retko 4) flagelarnim segmentima i kraćem petiolusu (odnos dužina/širina iznosi 1,94–2,0). Takođe, boja skapusa, pedicela i osnove F1 se razlikuje od ostalih vrsta po tome što varira od braonkaste do žute. *Ephedrus dysaphidis* je parazitoid biljnih vaši roda *Dysaphis* na jabuci.

U toku morfološkog ispitivanja jedinki vrsta *E. dysaphidis* i *E. cerasicola*, ustanovljeno je da većina karaktera ima iste ili preklapajuće vrednosti. U opisu vrste *E. cerasicola*, navedeno je da je F1 flagelarni segment više od tri puta duži nego što je širok, dok je u studiji Tomić et al. (2005) odnos dužine i širine F1 kod *E. dysaphidis* 3,8–4,6. Takođe, odnos dužina F1 i F2 je identičan; kod *E. cerasicola* F1 je za jednu trećinu duži od F2, a kod *E. dysaphidis* taj odnos iznosi 1,28. Dalje, opisi obe vrste navode propodeum istog oblika, sa istim brojem seta na bočnim gornjim i donjim areolama. Kod *E. cerasicola* odnos dužine i širine pterostigme je veći od četiri, dok taj odnos kod *E. dysaphidis* varira između 4,1 i 4,7. Na kraju, *E. cerasicola* poseduje petiolus koji je manje od duplo duži od svoje širine, a *E. dysaphidis* petiolus čiji se odnos kreće od oko 1,94 do 2,20. Ovaj karakter se u opisima za nijansu razlikuje, s obzirom da Starý (1958) ne navodi da *E. cerasicola* može posedovati petiolus duplo duži od svoje širine. Međutim, prilikom merenja petiolusa obe vrste, ustanovljeno je da i kod *E. cerasicola* dužina petiolusa dosta varira i da se odnos može kretati i do 2,1. Drugi karakter koji se navodi kao različit je broj mirisnih brazdi na F1 i F2, koji je 0 i 2 kod *E. cerasicola*, a 1–2(3) i 2–3(4) kod *E. dysaphidis*. Međutim, prilikom ove studije ustanovljeno je da jedinke *E. dysaphidis* mogu imati varijabilan broj mirisnih brazdi koji se preklapa sa brojem kod *E. cerasicola* i da se u istom uzorku mogu naći jedinke koje imaju F1=0, F2=1 ili F1=1, F2=3. Ovakav broj mirisnih brazdi (F1=1 i F2=3) za *E. cerasicola* navodi i Gärdenfors (1986).



Još jedna navedena razlika između ove dve vrste predstavlja boja flagelarnih segmenata: kod *E. cerasicola* opis jasno govori o skapusu, pedicelu, F1 i delu F2 koji su žućkasto braon (Starý, 1962) ili o skapusu koji je žućkast do braon, a pedicel i osnova ili ceo F1 žuti, dok je F2 žućkast samo u osnovi. Pri pregledanju materijala obe vrste ustanovljeno je da postoje svi navedeni tipovi obojenosti kod obe vrste, ali da je najčešća ona koju prati opis *E. cerasicola* (Starý, 1962).

Mada postoji morfološka varijabilnost unutar vrste *E. cerasicola* koja se dovodi u vezu sa izborom domaćina i usled koje je i opisana vrsta *E. dysaphidis*, nakon pregledanih svih dostupnih uzoraka, ustanovljeno je da je *E. dysaphidis* mlađi sinonim vrste *E. cerasicola*.

#### Pregledani material

***E. dysaphidis***: Holotip ♀ Srbija, Beograd, 08.05.1995., sa *Dysaphis* sp. na *Malus domestica*. Paratipovi 3♀ Srbija, Beograd, 08.05.1995., sa *Dysaphis* sp. na *Malus domestica*. 1♀ Srbija, Beograd, Radmilovac, 22.04.1992., sa *Dysaphis* sp. na *Malus domestica*. 3 ♀ Srbija, Beograd, Zemun, 22.04.2014., sa *Dysaphis devectora* Walker na *Malus* sp. 2 ♀ Srbija, Beograd, 24.04.2014., sa *Dysaphis devectora* na *Malus* sp.

***E. cerasicola***: 1♀ Crna Gora, Zminje jezero, 04.08.1982. 1♀ Srbija, Beograd, Crveni krst, 14.06.1997., sa *Myzus cerasi* Fabricius 1775 na *Prunus cerasus*. 1♀ Srbija, Mladenovac, 11.06.1990. 1♀ Srbija, Beograd, Novi Beograd, 17.06.1993., sa *Phorodon humuli* Schrank, 1801 na *Prunus cerasifera*. 1♀ Srbija, Kopaonik, 05.07.1997., sa *Brachycaudus helichrysi* Kaltenbach, 1843 na *Myosotis* sp. 2♀1♂ Srbija, Subjel, 01.05.2017., sa *Dysaphis pyri* Boyer de Feonscolombe, 1841 na *Pyrus communis*. 4♀ Belgija: sa *Dysaphis plantaginea* na *Malus* sp.

Vrsta *E. blattnyi* je specijalizovani parazitoid opisan na osnovu jednog nalaza u Češkoj, odgajen sa kolonije vaši *Pterocomma ringdahli* (= *Pterocomma rufipes*) sa vrbe *Salix caprea*. Nekoliko autora je tokom proteklih godina dovelo u pitanje status ove vrste. Gärdenfors (1986) u svojoj studiji navodi da je pregledan tipski materijal izuzetno sličan vrsti *E. plagiator* i da je moguće da je to zapravo aberantni uzorak te vrste. Takođe, Koponen & Halme (1993) pronalaze jedinke koje odgovaraju opisu *E. blattnyi*, ali ih ne uključuju u studiju jer smatraju da karakteri koji ih odvajaju od *E. plagiator* nisu dovoljno pouzdani. Tomanović (2000) takođe pronalazi jedinke koji odgovaraju opisu *E. blattnyi* sa istog domaćina, pri čemu navodi da je ova vrsta izuzetno slična vrstama *E. plagiator* i *E. prociphili*.

Analizom materijala koji morfološki odgovara opisu *E. blattnyi*, a koji je sakupljen sa *P. rufipes* na *Salix retusa*, došlo se do zaključka da se on ne razlikuje na molekularnom nivou od vrste *E. plagiator*, pri čemu je genetička distanca bila 0,2%–0,7%. S obzirom na rezultate molekularne i morfoloske analize, došlo se do zaključka da *E. blattnyi* predstavlja biotip vrste *E. plagiator*, sa kojom se sinonimizira.

## PODRODOVI I GRUPE VRSTA RODA *EPHEDRUS* U EVROPI

Rezultati ove studije su doveli do zaključka da je neophodna revizija subgeneričke klasifikacije roda *Ephedrus*, pa se iz tog razloga predlaže nova. Podrod *Lysephedrus* Starý se klasifikuje kao mlađi sinonim podroda *Ephedrus*, iz kog se *persicae* grupa vrsta podiže na nivo podroda *Fovephedrus* Chen. Podrodovi *Fovephedrus* i *Ephedrus* su ponovo opisani.

Podrod *Fovephedrus* Chen, 1986

Tipška vrsta: *Fovephedrus radiatus* Chen, 1986

Etimologija: Ime potiče usled prisustva fovealne jamice na mezoskutumu tipske vrste.

Dijagnoza: 3RSa nerv je kraći od 2RSa (odnos 3RSa/2RSa je manji od 1), petiolus je kratak i zdepast.

Opis. F1 je sa malim brojem mirisnih brazdi, od 0 do 3, retko 4. Mezoskutum najčešće poseduje jednu ili dve fovealne jamice, ponekad nema ni jednu. Skutelarna foseta nikad nije podeljena. 3RSa nerv je kraći od 2RSa (0,55–0,95). 3RSb nerv je duži od 3RSa 2,65–3,4 puta. Petiolus je kratak i širok (odnos dužina/širina iznosi 1,3–1,5) bez postlateralnih udubljenja. Legalica može biti kratka i široka ili izdužena.

Vrste u Evropi: *Ephedrus persicae* Froggatt, 1904, *Ephedrus chaitophori* Gärdenfors, 1986, *Ephedrus lonicerae* Tomanović, Kavallieratos & Starý, 2009, *Ephedrus tamaricis* Tomanović & Petrović, 2016

Podrod *Breviephedrus* Gärdenfors, 1986

Tipška vrsta: *Ephedrus brevis* Stelfox, 1941

Etimologija: Ime potiče od imena tipske vrste, *Ephedrus brevis*

Dijagnoza: 3RSa nerv je značajno duži od 2RSa. Petiolus je kvadratan, sa dorzo-lateralnim brazdama, neznatno naboran i sa nekoliko seta. Površina legalice poseduje retko raspoređene sete. Skutelarna foseta je uvek podeljena na dva jednaka dela.

Opis. Antene sa dugačkim prvim flagelarnim segmentom koji je bez mirisnih brazdi ili poseduje samo jednu. Skutelarna foseta je uzdužnom brazdom podeljena na dva jednaka dela. 3RSa nerv je izuzetno dugačak. Petiolus je kvadratan, bez post-lateralnih udubljenja. Ploče legalice se postepeno sužavaju i završavaju zaobljenim vrhom koji na sebi nosi nekoliko seta.

Vrste u Evropi: *Ephedrus brevis* Stelfox, 1941.

Podrod *Ephedrus* Haliday, 1833

*Lysephedrus* Starý, 1958 syn.nov.

Tipična vrsta: *Ephedrus plagiator* Haliday, 1833

Dijagnoza: 3RSa je duži ili skoro jednak 2RSa nervu, petiolus je izdužen.

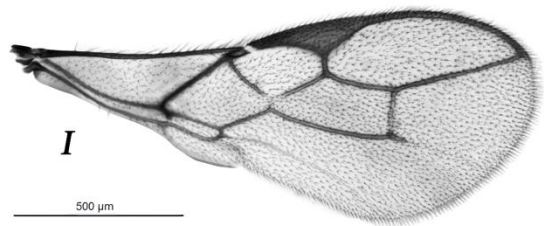
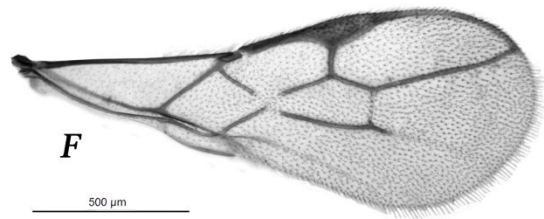
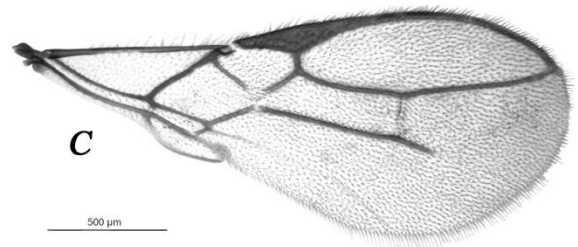
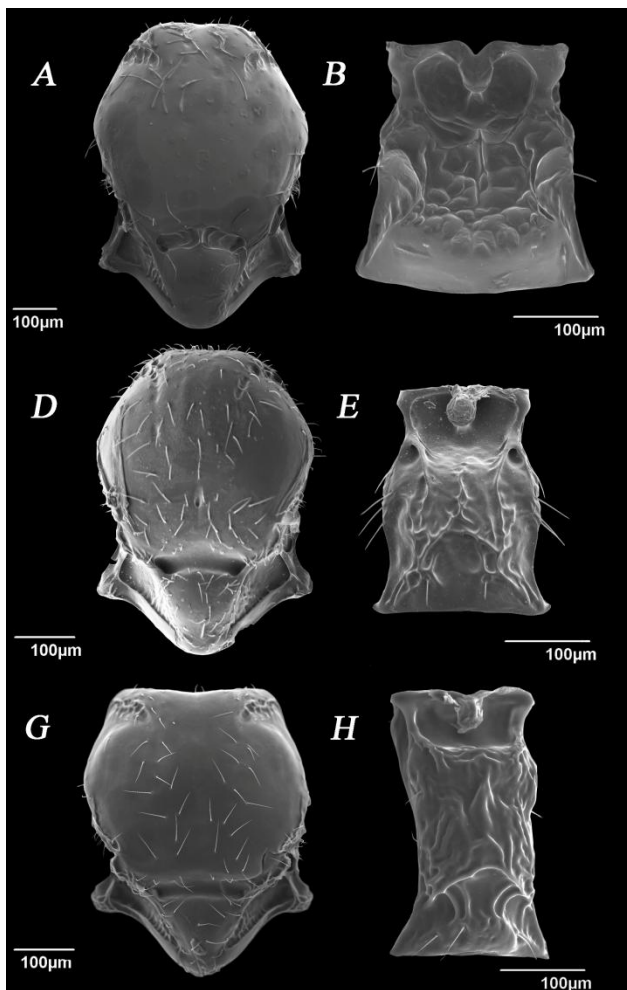
Opis: F1 poseduje varijabilan broj mirisnih brazdi (0–5). Na mezoskutumu se nikada ne nalazi fovealna jamica (osim kod *lacertosus* grupe vrsta, gde je uvek prisutna kod *E. longistigmus*, a retko kod *E. lacertosus*). Skutelarna foseta nikada nije podeljena. 3RSa varira u dužini od prilično dugačkog (kod *E. validus*) do skoro jednakog 2RSa (1,1–1,5). Odnos 3RSb/3RSa iznosi 1,7–2,6. Propodeum i petiolus su kod većine vrsta bez nabora, dok su kod *E. validus* izuzetno naborani. Petiolus je izdužen, sa ili bez post-lateralnih udubljenja. Legalica je obično izdužena, kod manjeg broja vrsta može biti kratka i široka.

Vrste *plagiator* grupe u Evropi: *Ephedrus cerasicola* Starý, 1962; *Ephedrus helleni* Mackauer, 1968; *Ephedrus hyadaphidis* Kocić & Tomanović; *Ephedrus koponeni* Halme, 1992; *Ephedrus laevicollis* (Thomson, 1895); *Ephedrus nacheri* Quilis Perez, 1934; *Ephedrus niger* Gautier, Bonnamour & Gaumont, 1929; *Ephedrus plagiator* (Nees, 1811); *Ephedrus prociphili* Starý, 1982; *Ephedrus vaccinii* Gärdenfors, 1986; *Ephedrus validus* Haliday, 1833

Vrste *lacertosus* grupe u Evropi: *Ephedrus lacertosus* (Haliday, 1833) i *E. longistigmus* Gärdenfors 1986.

Tabela 11. Ključ za identifikaciju podrodova roda *Ephedrus*

	1.	Skutelarna foseta je podeljena na dva dela (Slika 13A), 3Rsa je vrlo dug (Slika 13C)	<i>Breviephedrus</i>
	-	Skutelarna foseta nepodeljena (Slike 13D,G). 3RSa nerv duži, iste dužine ili kraći od 2RSa (Slike 13F,I).	2
	2.	3Rsa je vidljivo ili neznatno kraći od 2RSa (Slika 13F). Petiolus je subkvadratan ili kvadratan (Slika 13E).	<i>Fovephedrus</i>
	-	3Rsa je duži ili jednak 2RSa (Slika 13I), petiolus je izduženiji (Slika 13H).	<i>Ephedrus</i>



Slika 13. *Breviephedrus* (*E. brevis*), *Fovephedrus* (*E. persicae*) i *Ephedrus* (*E. plagiator*) podrodovi. A–C *Breviephedrus*: A–mezoskutum, B–petiolus, C–prednje krilo; D–F *Fovephedrus*: D–mezoskutum, E–petiolus, F–prednje krilo; G–I *Ephedrus*: G–mezoskutum, H–petiolus, I–prednje krilo.

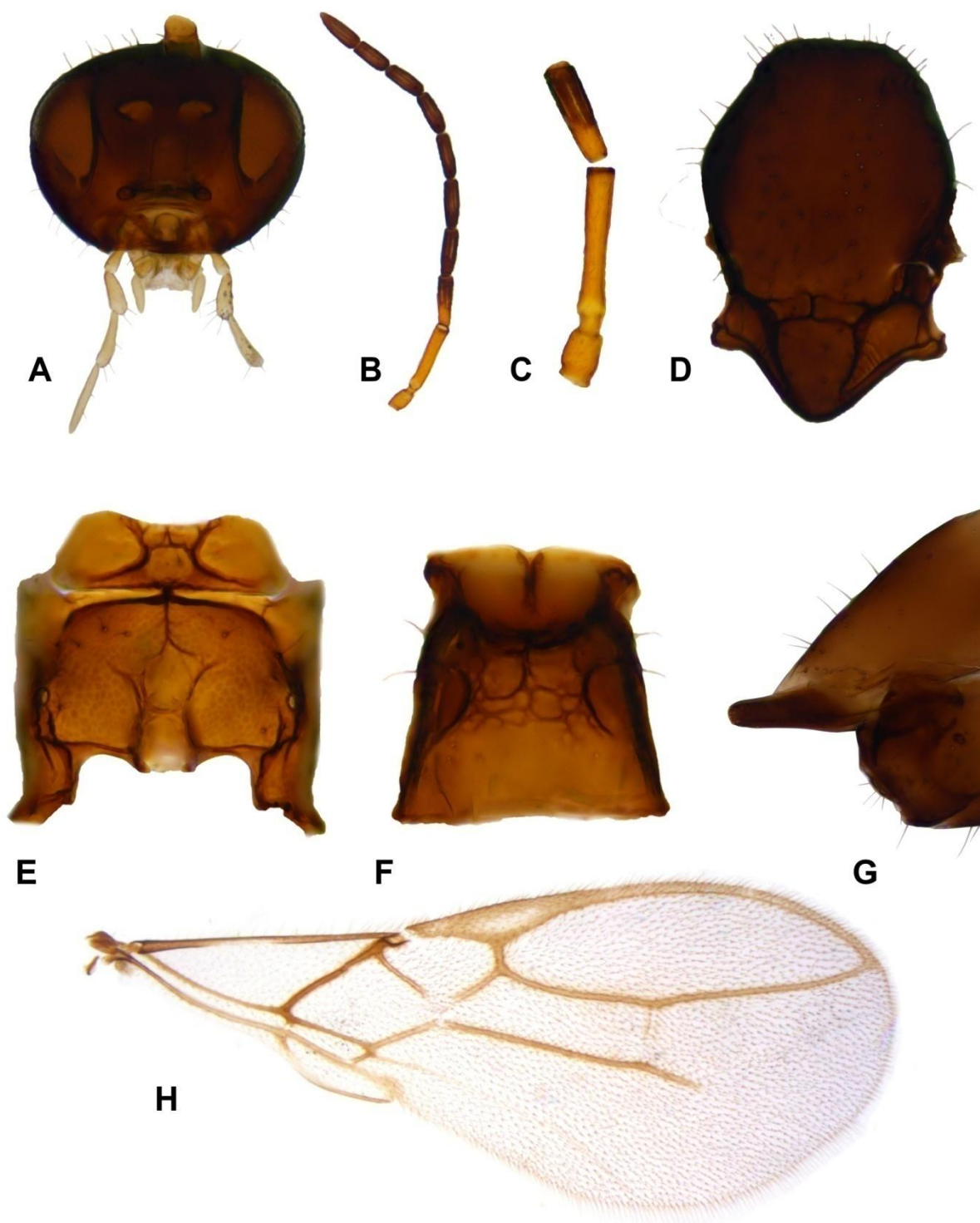
Tabela 12. Ključ za identifikaciju evropskih vrsta roda *Ephedrus*. Karakteri vrsta koje nisu bile dostupne za analizu (*E. vaccini* i *E. longistigmus*) preuzeti su iz studije Gärdenfors (1986).

1.	Skutelarna foseta podeljena na dva dela (Slika 14D). 3RSa nerv veoma dug (Slika 14H).	<i>E. brevis</i> ( <i>Breviephedrus</i> )
-	Skutelarna foseta nepodeljena (Slike 11D, 12D, 15D–26D). 3RSa nerv duži, iste dužine ili kraći od 2RSa.	2
2.	3RSa je vidljivo ili neznatno kraći od 2RSa (Slike 11F, 15H, 16H). Petiolus je subkvadratan ili kvadratan (Slike 11G, 15F, 15F).	3 ( <i>Fovephedrus</i> )
-	3Rsa je duži ili jednak 2Rsa (Slike 12H, 17H–26H), petiolus je izdužen (Slike 12F, 17F–26F).	6 ( <i>Ephedrus</i> )
3.	Prvi flagelarni segment F1 izdužen, odnos dužine i širine iznosi 5,00–5,30. F1 i prva polovina F2 žute boje. Specijalizovani parazitoid vaši <i>Hyadaphis foeniculi</i> na biljkama roda <i>Lonicera</i> (Slika 15).	<i>E. lonicerae</i>
-	Prvi flagelarni segment kraći, odnos dužine i širine 3,70–4,90. F1 braon ili sa žutim prstenom u osnovi. F2 braon.	4
4.	Antene neznatno zadebljale u vršnom delu. F1 potpuno braon, 3,6–4,2 puta duži od svoje širine (Slika 16).	<i>E. persicae</i>
-	Antene jasno zadebljale prema vrhu. F1 u prvoj polovini žut, ili samo sa žutim prstenom u osnovi, odnos dužine i širine iznosi 4,5–4,9.	5
5.	Prva polovina F1 žuta. F2 je za jednu trećinu ili jednu polovinu kraći od F1. Specijalizovani parazitoid vaši iz roda <i>Chaitophorus</i> na	<i>E. chaitophori</i>

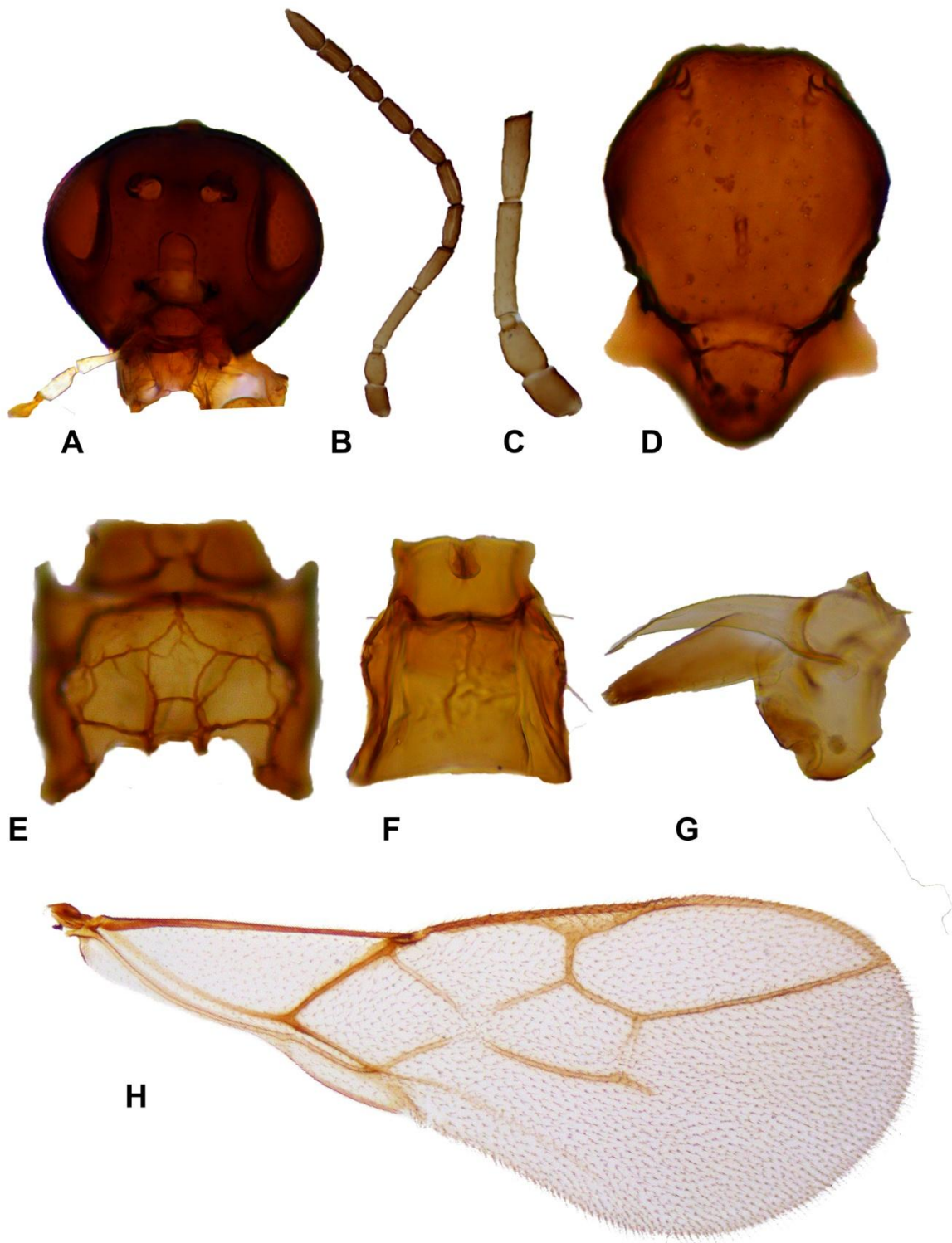
	topolama i vrbama.	
-	Prvi flagelarni segment F1 sa žutim prstenom u osnovi, dužina F1 skoro jednaka dužini F2. Specijalizovani parazitoid vaši <i>Brachyunguis tamaricis</i> (Slika 11).	<i>E. tamaricis</i>
6.	Propodeum i petiolus izuzetno naborani, legalica kratka, gotovo trouglastog oblika, zaobljena na vrhu i prekrivena gustim dlakama. Specijalizovani parazitoid vaši korena biljaka (Slika 17).	<i>E. validus</i>
-	Propodeum i petiolus glatki do neznatno naborani, legalica izdužena i sa sporadičnim dlakama (Slike 12E, 18E–26E; 12F, 18F–26F; 12G, 18G–26G).	7
7.	Antene kratke, dostižu dužinu do propodeuma i jasno zadebljale na vrhovima (Slike 18B, 19B)	8
-	Antene duže, dostižu dužinu do metazome, končaste (Slike 12B, 20B–26B)	9
8.	Osmi i deveti flagelarni segmenti nisu jasno razdvojeni. Specijalizovan parazitoid roda <i>Chaetosiphon</i> na ružama (Slika 18).	<i>E. laevicollis</i>
-	Osmi i deveti flagelarni segmenti su jasno razdvojeni, specijalizovan parazitoid vaši iz roda <i>Cavariella</i> na vrbama i topolama (Slika 19).	<i>E. helleni</i>
9.	Prvi flagelarni segment vrlo izdužen, odnos dužine i širine iznosi 5,3–6,9. (Slika 20C).	10
-	Prvi flagelarni segment različite dužine, odnos dužine i širine iznosi 2.45–5.0 (Slike 12C, 21C–26C).	11
10.	Mezoskutum sa ravnomerno raspoređenim dlakama, fovealna jamica uvek prisutna	<i>E. longistigmus</i>
-	Mezoskutum sa dlakama prisutnim samo u prvom delu i duž brazdi, fovealna jamica retko prisutna (Slika 20).	<i>E. lacertosus</i>
11.	Prvi flagelarni segment dužine 2.45–3.5 (Slike 12C, 21C)	12
-	Prvi flagelarni segment dužine 3.6–5.0 (Slike 22C–26C)	13
12.	Prvi flagelarni segment izuzetno kratak, 2.45–2.65 dugačak koliko širok. Specijalizovan parazitoid biljne vaši <i>Hyadaphis foeniculi</i> (Slika 12).	<i>E. hyadaphidis</i>
-	Prvi flagelarni segment kratak, 3.0–3.5 dugačak koliko širok. Parazitoid vaši roda <i>Hayhurstia</i>	<i>E. nacheri</i>

	(Slika 21).	
13.	Prvi flagelarni segment sa suženjem u prvoj trećini. Telo tamnobraon do crno. Legalica poseduje subapikalno suženje. Pretežno parazitoid vaši rodova <i>Macrosiphoniella</i> i <i>Uroleucon</i> (Slika 22).	<i>E. niger</i>
-	Prvi flagelarni segment bez suženja. Telo svetlobraon do braon boje. Legalica ne poseduje subapikalno suženje (Slike 23C,G–26C,G)	14
14.	Broj mirisnih brazdi na prvom flagelarnom segmentu 0-2 (Slika 23C, 24C).	15
-	Broj mirisnih brazdi na prvom flagelarnom segmentu 3-7 (Slika 25C, 26C).	17
15.	Prvi flagelarni segment F1 žut, drugi flagelarni segment F2 žut u osnovi, prvoj trećini ili u potpunosti. Parazitoid vaši <i>Myzus</i> i <i>Dysaphidis</i> u voćnjacima (Slika 23).	<i>E. cerasicola</i>
-	Prvi flagelarni segment u prvoj trećini nešto svetliji, drugi flagelarni segment i ostatak antene braon (Slika 24B, C).	16
16.	Drugi flagelarni segment sa malim brojem mirisnih brazda (0–1). Specijalizovan parazitoid <i>Elatobium abietinum</i> vaši sa jela (Slika 24).	<i>E. kopenhageni</i>
-	Drugi flagelarni segment sa većim brojem mirisnih brazda (najčešće 5). Specijalizovan parazitoid vaši sa borovnica.	<i>E. vaccinii</i>
17.	Skapus, pedicel i najmanje 1/3 F1 žuti, kao i osnova F2. Kokse i noge žućkaste boje. Specijalizovan parazitoid vaši roda <i>Prociphilus</i> na jasenu (Slika 25).	<i>E. prociphili</i>
-	Osnova F1 svetlobraon do žućkaste boje, ostatak antene braon. Kokse braon, noge varijabilne boje (Slika 26).	<i>E. plagiator</i>

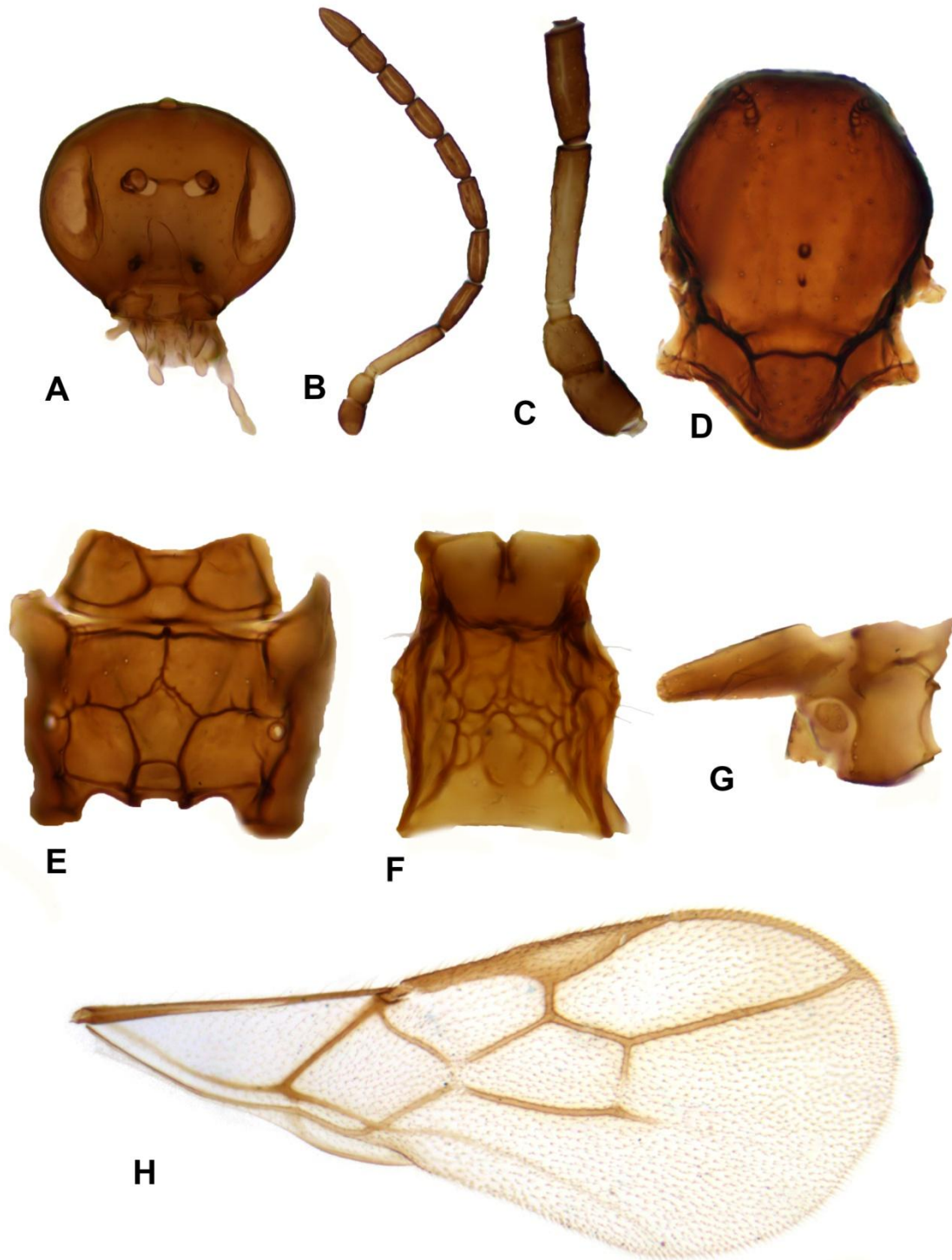




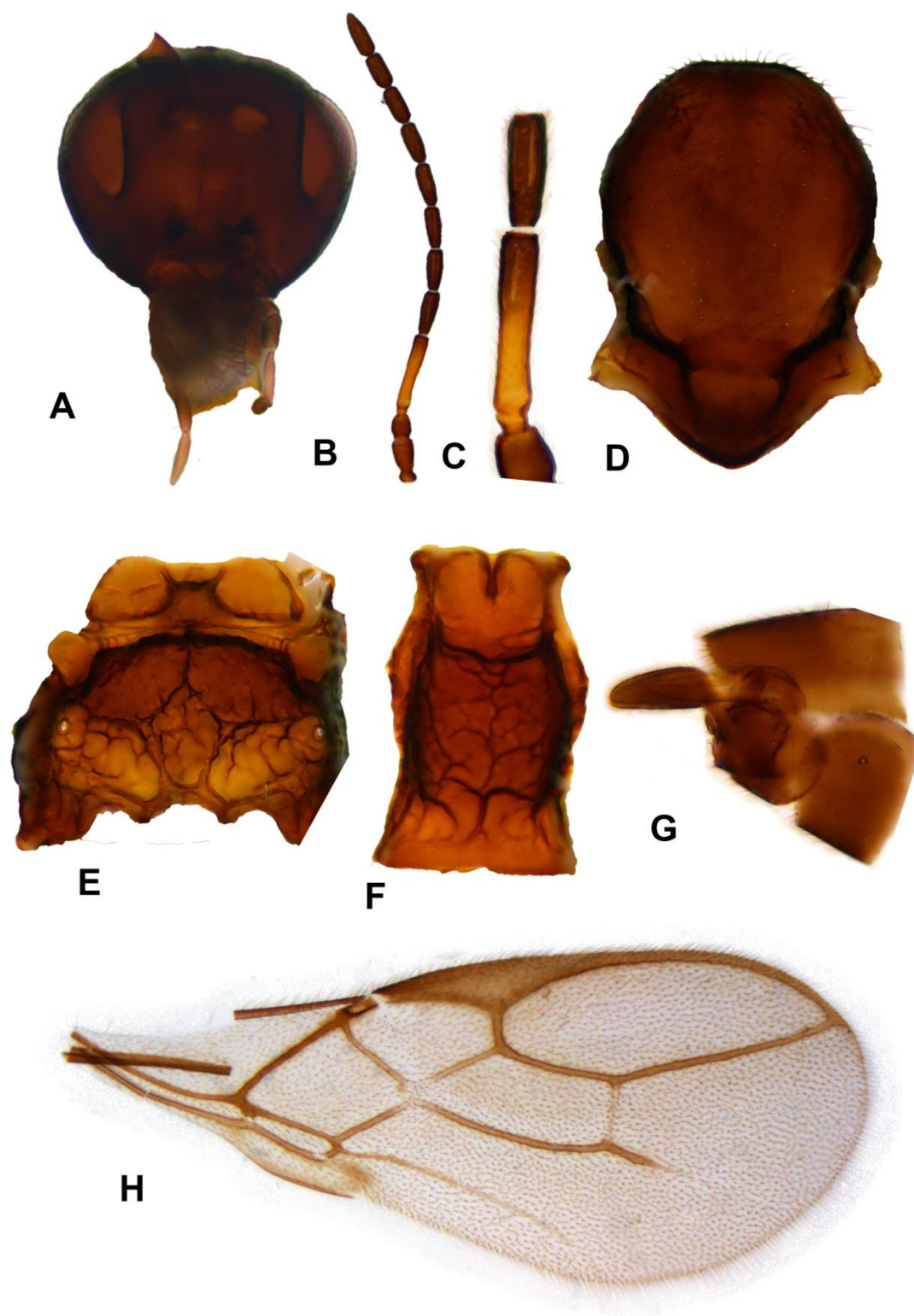
Slika 14. *Ephedrus brevis* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo



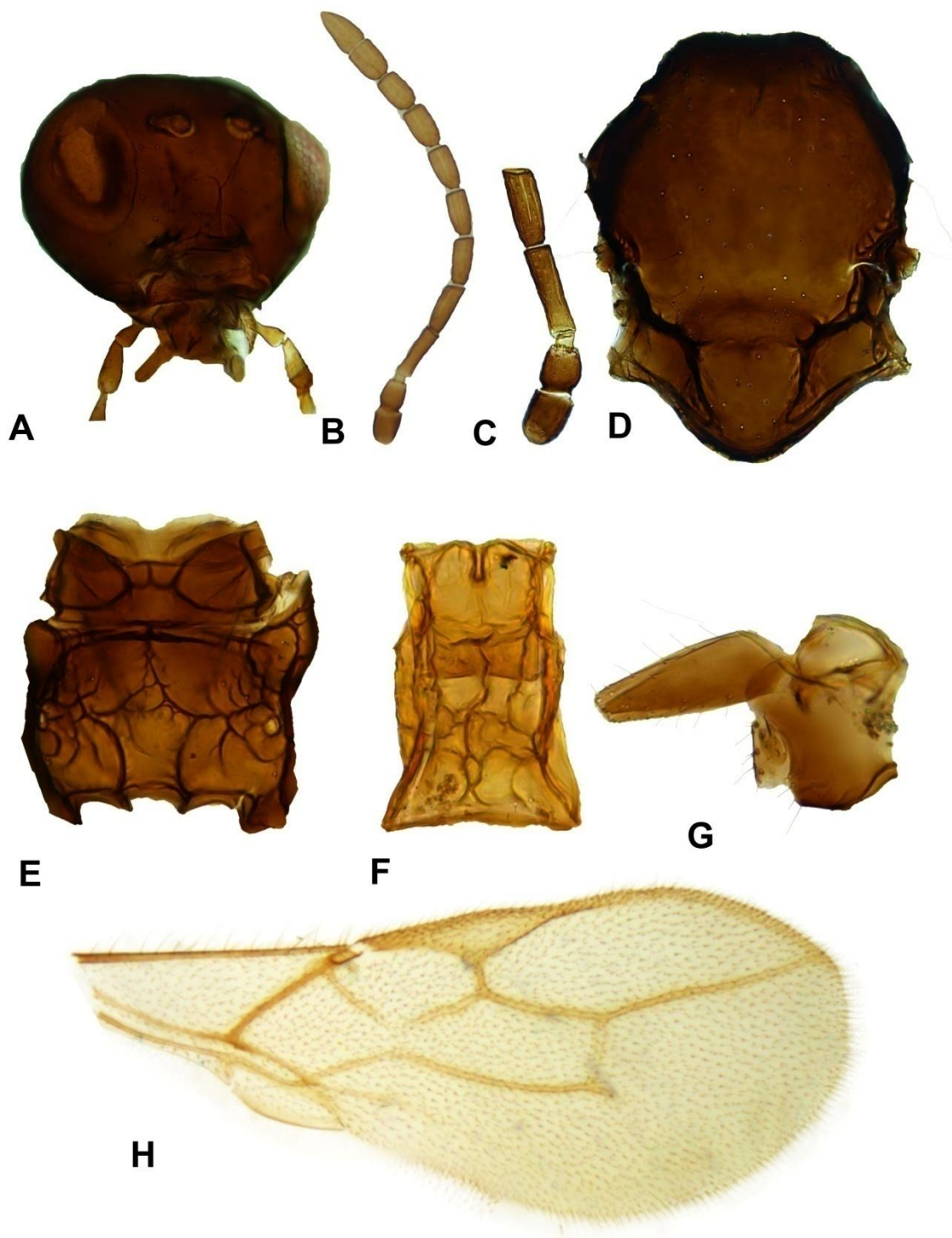
Slika 15. *Ephedrus lonicerae* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskoputum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo



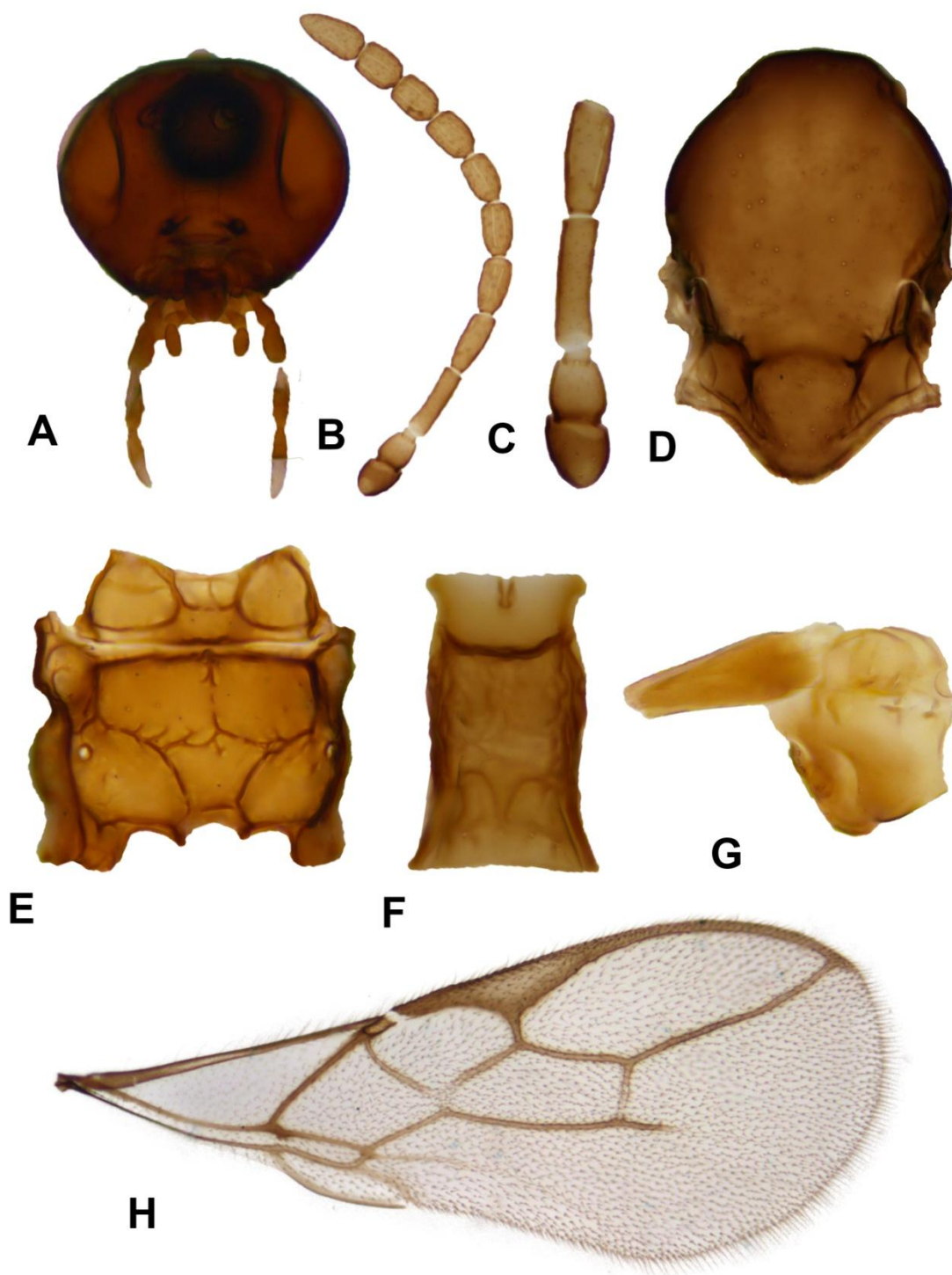
Slika 16. *Ephedrus persicae* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo



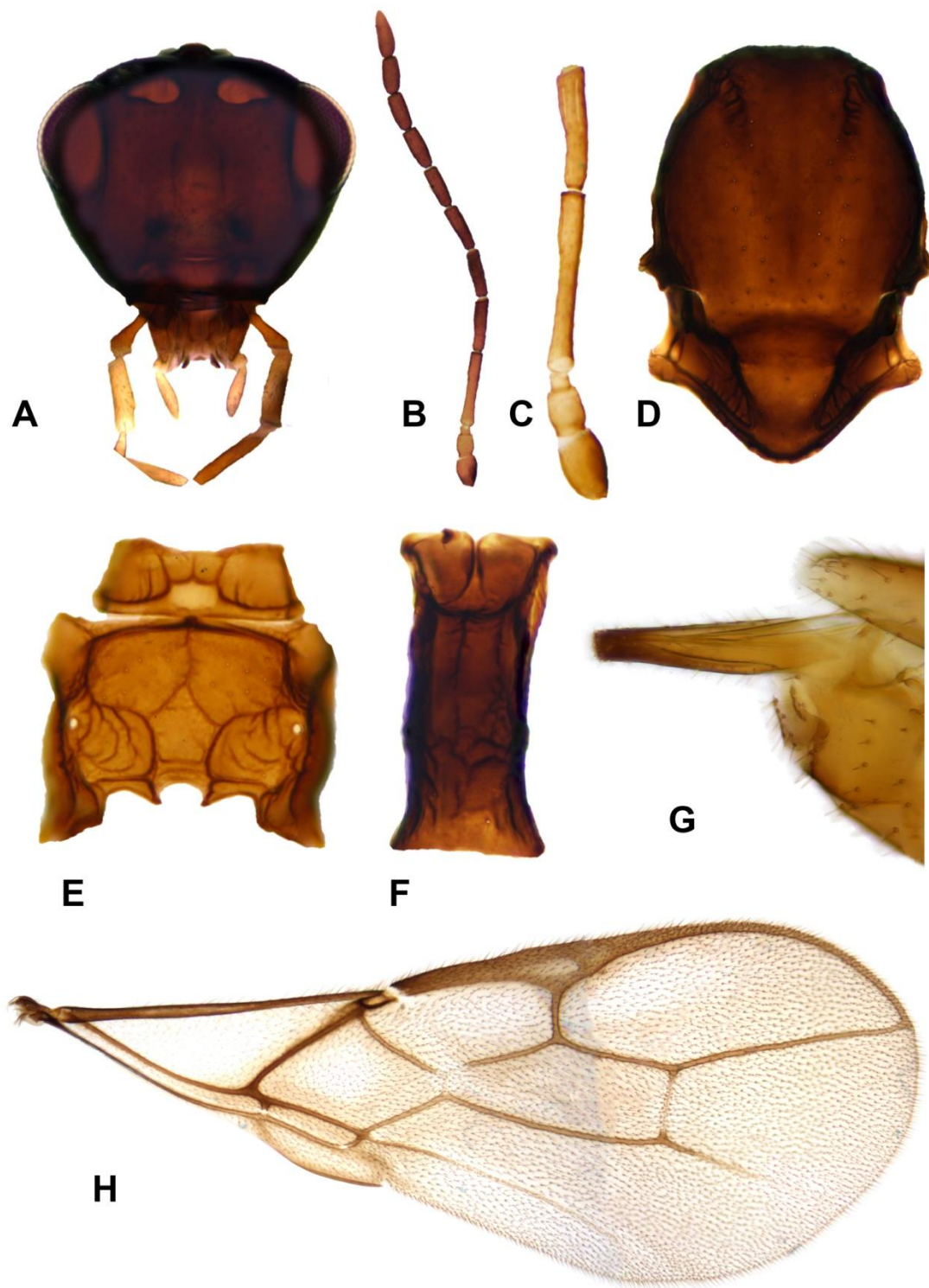
Slika 17. *Ephedrus validus* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo



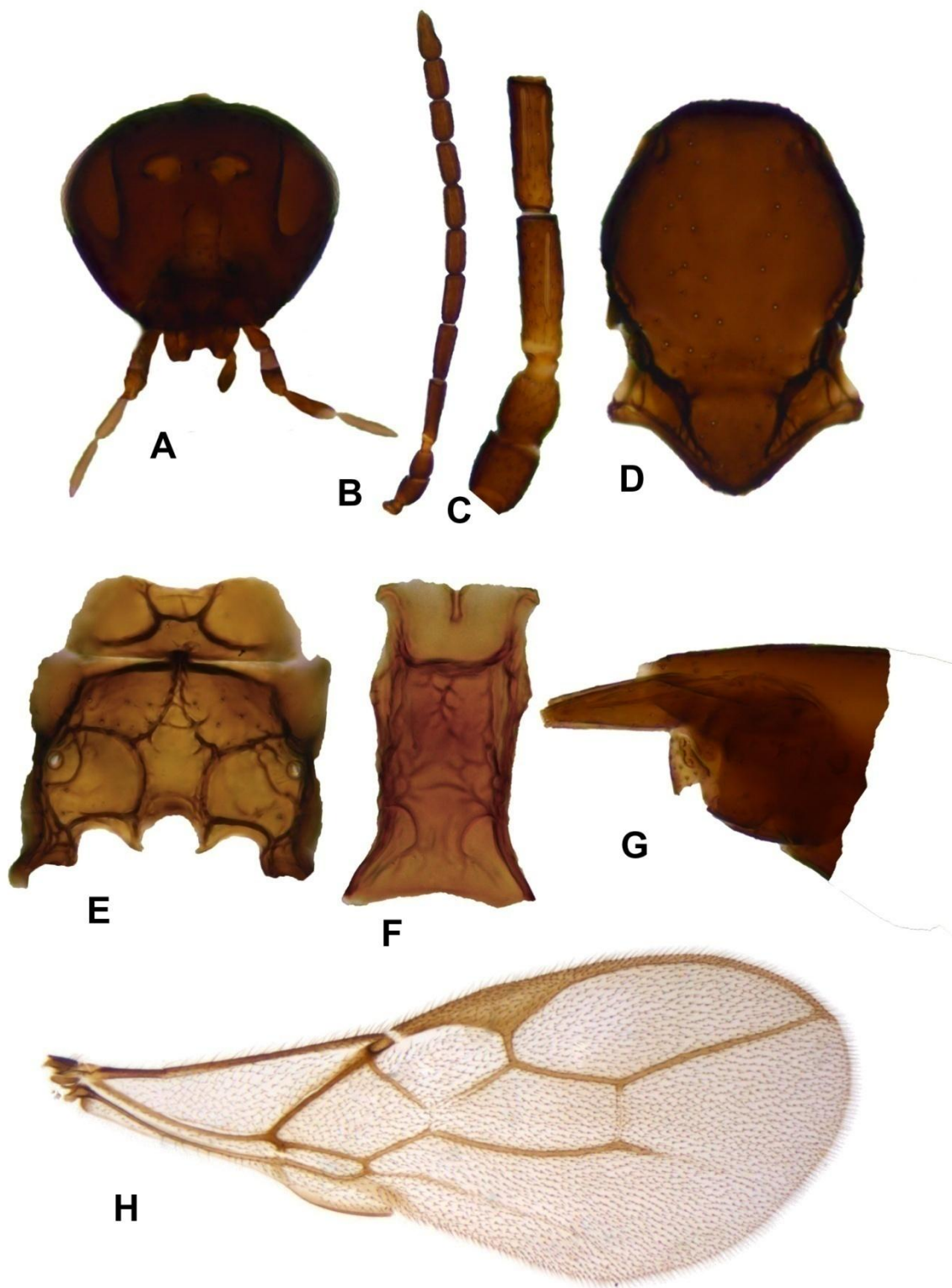
Slika 18. *Ephedrus laevicollis* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo



Slika 19. *Ephedrus helleni* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo

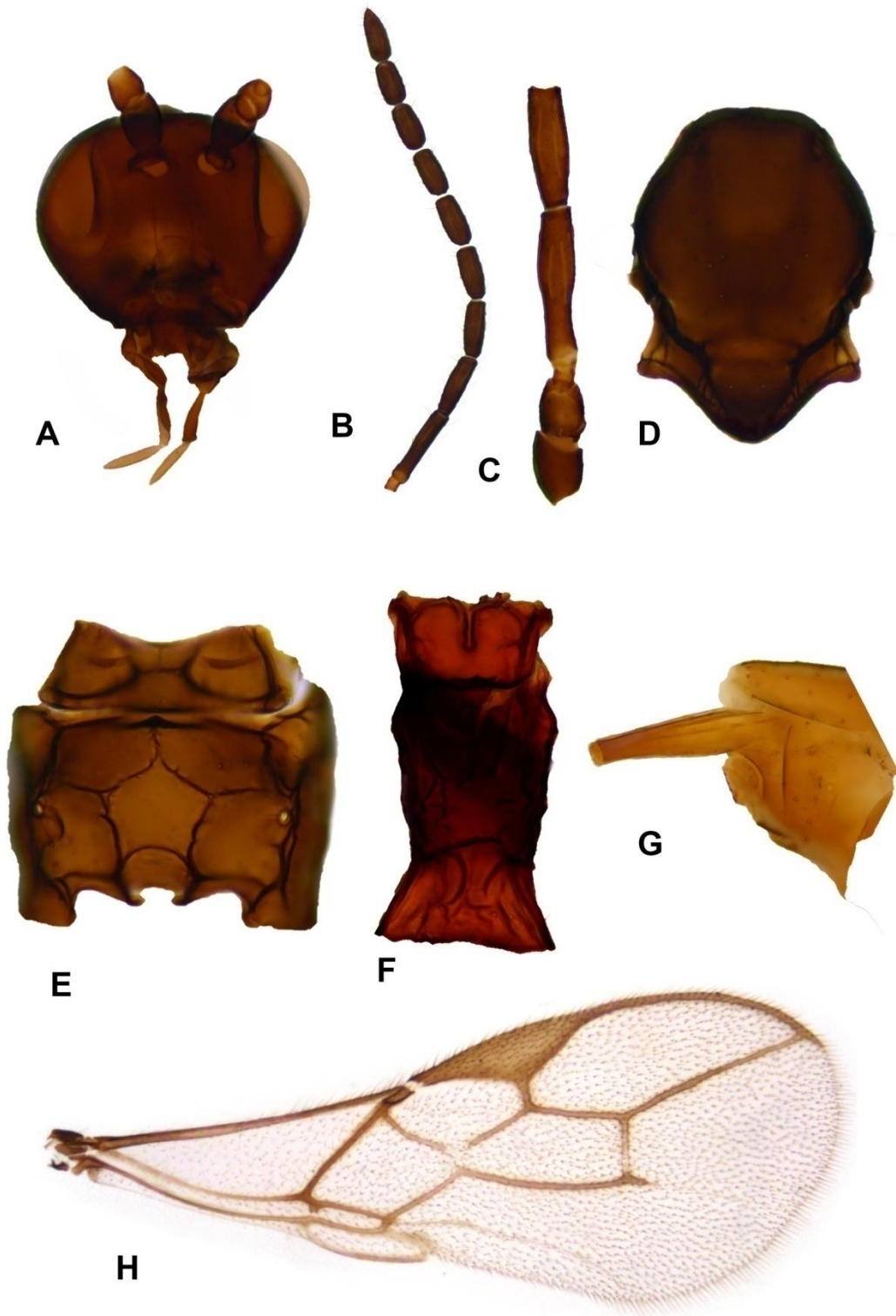


Slika 20. *Ephedrus lacertosus* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo

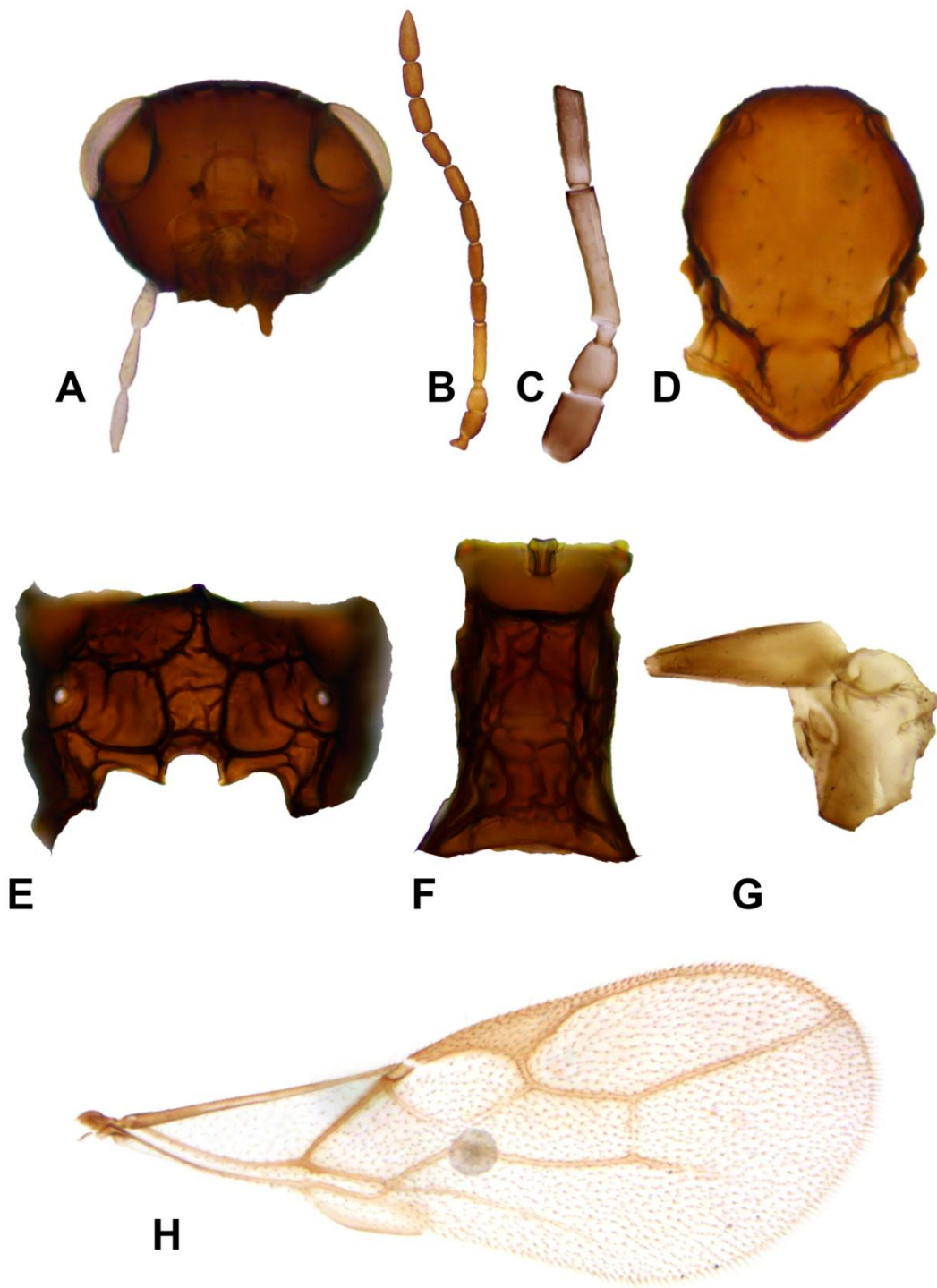


Slika 21. *Ephedrus nacheri* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo

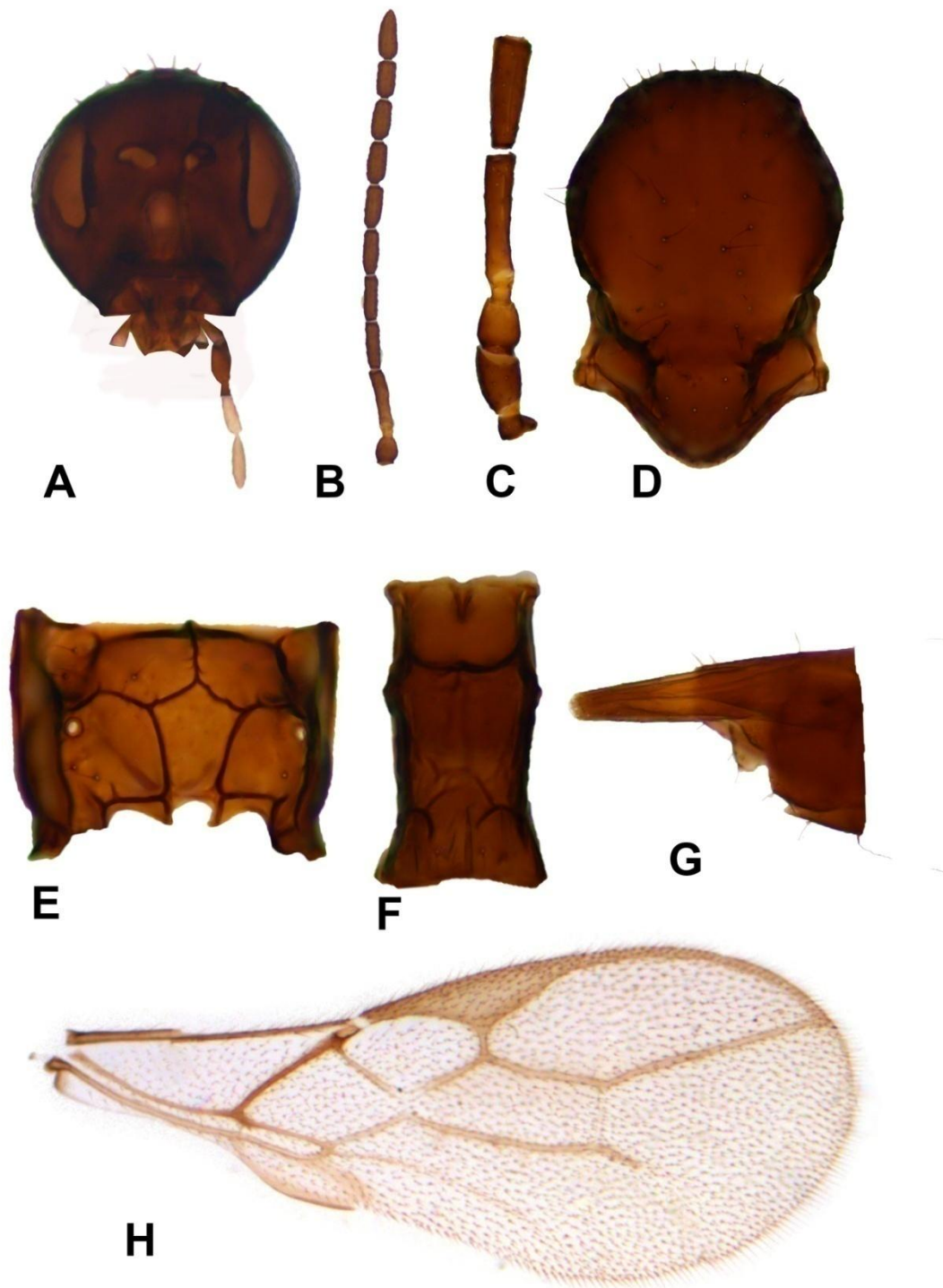




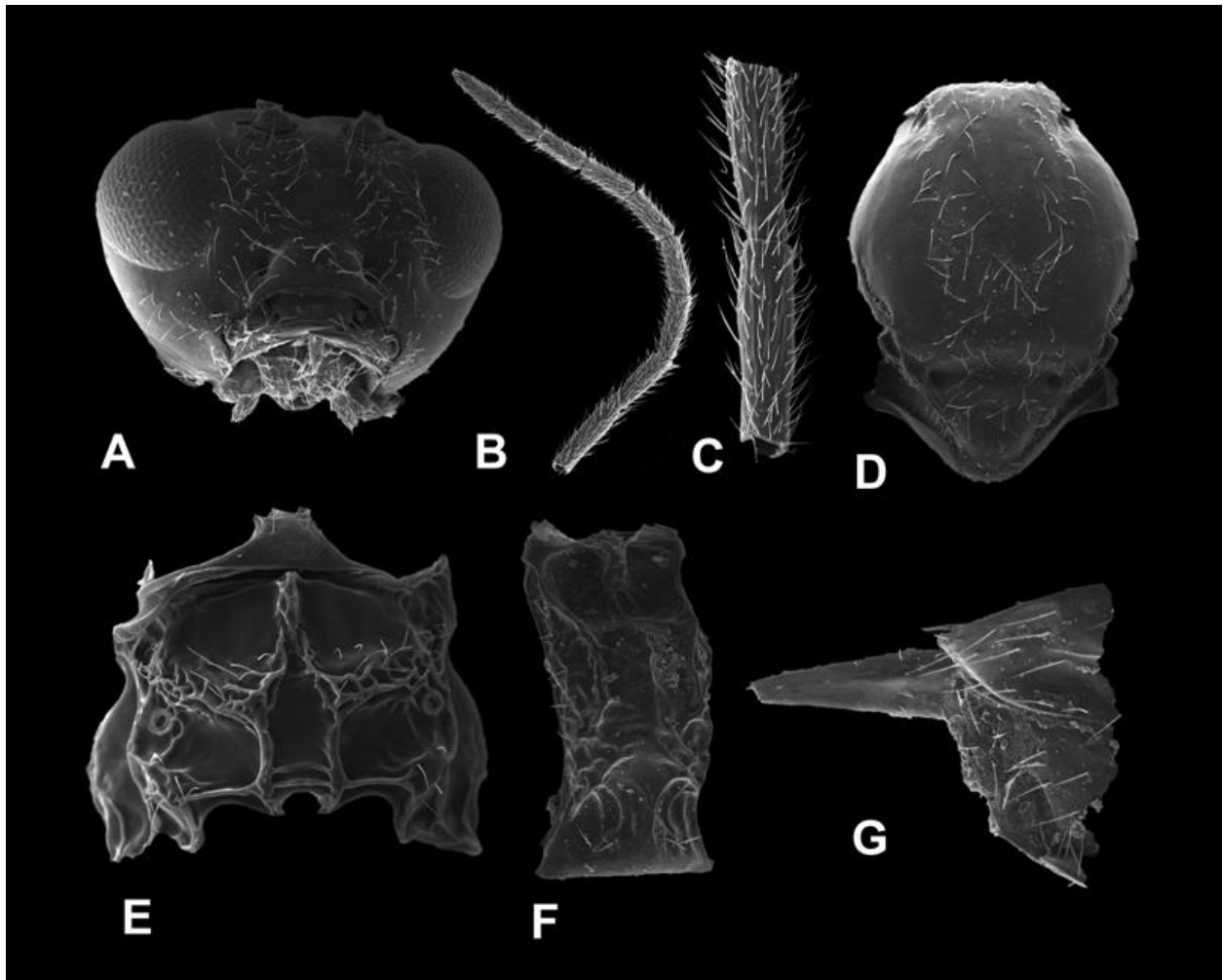
Slika 22. *Ephedrus niger* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo



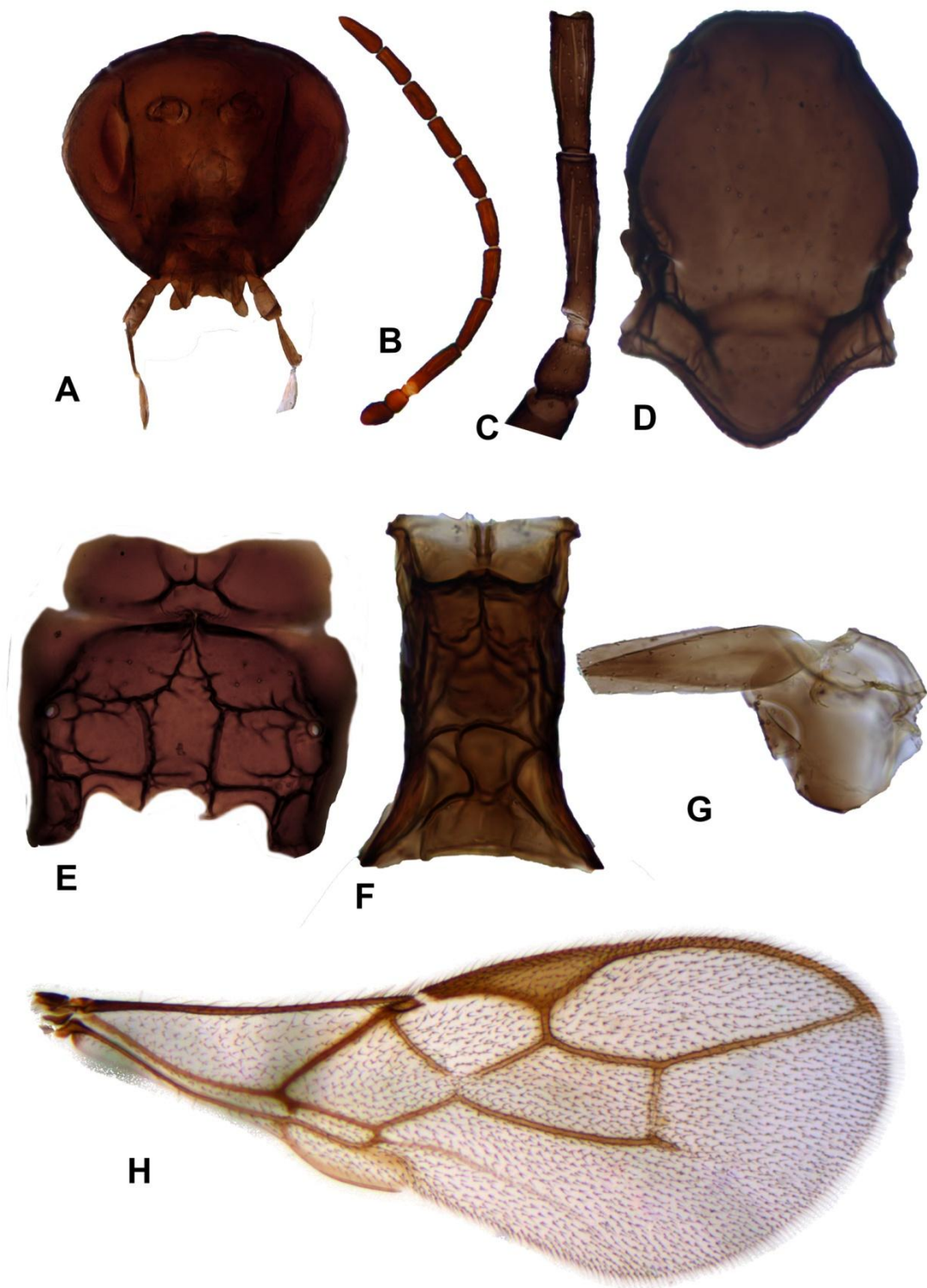
Slika 23. *Ephedrus cerasicola* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezokutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo



Slika 24. *Ephedrus kopenhageni* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo



Slika 25. *Ephedrus prociphili* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo



Slika 26. *Ephedrusplagiator* A–glava, B–antena, C–prvi i drugi flagelarni segment, D–mezoskutum, E–propodeum, F–petiolus, G–legalica, H–prednje krilo

## DISKUSIJA

Kontinuirano napredovanje molekularnih metoda u taksonomiji, omogućava nam da bez poteškoća sekvenciramo odabrane genske regione i uporedimo ih sa rezultatima morfološke i ekološke analize u cilju dobijanja što jasnije slike filogenetskih odnosa i evolucije određene grupe.

U ovoj studiji korišćena su dva molekularna markera kako bi se utvrdio taksonomski položaj i filogenija evropskih vrsta u okviru roda *Ephedrus*. Kao što su predložili Derocles et al. (2016), upotrebljena je kombinacija mitohondrijskog i nuklearnog markera. Kao najbolji molekularni metod pri studiji rodova i vrsta unutar potfamilije Aphidiinae često se navodi upotreba kombinacije mitohondrijskih i jedarnih molekularnih markera (Derocles et al., 2012). CBOL (Consortium for the Barcode of Life) je definisao region u genu koji kodira subjedinicu I citohrom *c* oksidaze (Folmer et al., 1994) kao standardni molekularni barkod za životinje. Nedavna studija Derocles et al. (2016), analizirala je sedam genskih regiona predstavnika potfamilije Aphidiinae: COI, citohrom B (*cytB*), 16s rRNK, 28s rRNK, dugotalasni rodopsin (*LWRh*), arginin kinazu (*ArgK*) i elongacioni faktor  $1\alpha$  (*EF1\alpha*). Rezultati ovog rada, pokazali su da je od svih sedam genskih regiona, COI imao najviše polimorfizama i samim tim omogućio razlikovanje grupa koje se primenom ostalih genskih regiona nisu razdvajale. Takođe, COI poseduje najveći procenat uspešne amplifikacije u odnosu na ostale do sad analizirane genske regione (Derocles et al., 2012; Derocles et al., 2016). Kao jedarni molekularni marker koji bi potvrdio rezultate COI, odabran je jedarni *EF1\alpha*. Prvi put korišćen u molekularnoj studiji potfamilije Aphidiinae od strane Belshaw & Quicke (1997), ovaj molekularni marker se smatra za visoko konzervativan, ali koristan u istraživanjima nižih taksonomskih nivoa koji su nedavno divergirali (Cho et al., 1995; Belshaw & Quicke, 1997). Pored toga, Derocles et al. (2016) navode u svojoj studiji da je *EF1\alpha* pogodan za razdvajanje klada unutar vrsta generalista *E. plagiator*, *L. fabarum* i *P. volucre*, mada sa dosta manjom rezolucijom nego što je to slučaj sa COI.

Prethodna istraživanja klasifikovala su vrste roda *Ephedrus* u tri podroda (*Ephedrus*, *Breviephedrus* (*E. brevis*) i *Lysephedrus* (*E. validus*)) na osnovu morfologije. Međutim, na osnovu rezultata integrativnog pristupa primenjenog u ovoj studiji, subgenerička klasifikacija

roda je revidirana. Sva tri novodefinisana podroda (*Fovephedrus*, *Breviephedrus* i *Ephedrus*) su se razdvojila sa najvišim genetičkim distancama zabeleženim unutar potfamilije Aphidiinae, koje su se kretale od 16,3% do 20,7%. Ove distance su približne ili veće od distanci između pojedinih rodova unutar ove potfamilije. Na primer, prosečna molekularna distanca između rodova *Trioxys* i *Binodoxys* iznosi 13,9%, *Lipolexis* i *Aphidius* 16,6%, *Pauesia* i *Ephedrus* 21,6%, *Praon* i *Toxares* 18,2% i *Monoctonus* i *Lysiphlebus* 15,9%.

Vrsta *Ephedrus brevis*, trenutno jedina klasifikovana u podrod *Breviephedrus*, morfološki je lako prepoznatljiva (Gärdenfors, 1986) po robusnom, zdepastom telu sjajne crne boje, koje se ne sreće ni kod jedne druge vrste u okviru roda. Zanimljivo je naglasiti da ovaj parazitoid nikada nije odgajen iz afidnog domaćina, koji je i dalje nepoznat, mada se sumnja da je domaćin neka od vrsta biljnih vaši koja je u asocijaciji sa brezom (*Betula* sp.), s obzirom da su parazitoidi uvek sakupljeni u neposrednoj blizini breza (Stelfox, 1941; Gärdenfors, 1986). Ovu vrstu pojedini autori smatraju najprimitivnijom unutar podroda, usled posedovanja niza pleziomorfni morfoloških karaktera koji se mogu naći i kod roda *Parephedrus* (Gärdenfors, 1986). Ovakva činjenica navodi na sumnju da bi *E. brevis* sa jedne strane i *Parephedrus* sa druge mogli biti “most” u evoluciji, koji spaja arhaične rodove sa južne hemisfere *Parephedrus*, *Vanhartenia*, *Pseudephedrus* i *Choreopraon* sa ostatkom rodova potfamilije Aphidiinae. Kako bi se rasvetlili filogenetski odnosi pomenutih grupa, neophodno je sprovesti detaljne studije, posebno u novom svetlu molekularnih rezultata koji ne podržavaju prethodne tvrdnje da je *E. brevis* najprimitivnija vrsta roda *Ephedrus*.

Na osnovu prisustva fovealne jamice na mezoskutumu, Chen (1986) je opisao rod *Fovephedrus*, a kao tipsku vrstu naveo *Fovephedrus radiatus*. Na osnovu istog morfološkog karaktera nekoliko biotipova vrste *E. persicae* (*E. persicae*, *E. palaestinensis* (= *E. persicae* – videti Gärdenfors (1986), *E. rugosus*, *E. radiatus*, *E. transversus*) i *E. longistigmus* (član *lacertosus* grupe vrsta) je kasnije premešteno u ovaj rod (Chen & Shi, 2001). Van Achterberg (1997) je sinonimizirao *Fovephedrus* sa rodom *Ephedrus*, ali mu je dodelio status podroda. Međutim i pored toga u taksonomskoj literaturi, zbog nejasnog statusa vrsta unutar podroda, *Fovephedrus* nije navođen od strane istraživača, već isključivo klasifikacija data u poslednjoj reviziji roda (Gärdenfors, 1986). Klasifikacija isključivo na osnovu prisustva fovealne jamice je problematična iz nekoliko razloga. Prvi je taj što je prisustvo fovee karakteristika nekoliko

nesrodnih vrsta unutar roda *Ephedrus* (na primer *E. longistigmus* i *E. lacertosus* koji pripadaju *lacertosus* grupi i udaljeni su filogenetski od *persicae* grupe). Čak i u okviru vrste *E. persicae*, prisustvo fovee je vrlo varijabilno: u istom uzorku fovea može biti odsutna kod jedne jedinke, dok kod druge može postojati jedna jamica (što je najčešće stanje) ili pak dve. Na kraju, postojanje fovealne jamice nije karakteristično samo za rod *Ephedrus*, već se takođe može sresti kod nekih vrsta unutar roda *Toxares* (Tomanović et al., 2008). Zbog toga se ovaj dijagnostički karakter smatra nepouzdanim, posebno na nivou roda.

Tipski materijal vrste *Ephedrus radiatus* (*Fovephedrus radiatus*) nije bio dostupan za ovu studiju, međutim na osnovu priloženih crteža iz originalnog opisa (Chen 1986) moguće je zaključiti da se radi o vrsti iz *persicae* grupe. Takođe, *E. transversus* i *E. rugosus* na osnovu opisa pripadaju *persicae* grupi. Status prethodne tri vrste (*E. radiatus*, *E. transversus* i *E. rugosus*) tek treba da bude revidiran, ali na osnovu datih opisa, najverovatnije se radi o vrsti *E. persicae*. Kao što je spomenuto, *E. palaestinensis* je već sinonimiziran sa *E. persicae*, a *E. longistigmus* pripada *lacertosus* grupi vrsta.

Podrod *Fovephedrus* je predstavljen vrstama iz *persicae* grupe (*E. persicae*, *E. lonicerae*, *E. tamaricis* i *E. chaitophori*), a filogenetski odnosi unutar njega su detaljno razmatrani u studiji Petrović et al. (2016). U ovoj studiji, po prvi put je potvrđen status vrsta *E. tamaricis* i *E. chaitophori*. *Ephedrus chaitophori* je specijalizovani parazitoid biljnih vaši roda *Chaitophorus*, a preferira, kako vlažna močvarna staništa, tako i suvlje predele pod drvećem i žbunovima (Gärdenfors, 1986). Druge dve vrste podroda *Fovephedrus* takođe su specijalizovani parazitoidi, pri čemu je *E. tamaricis* do sad zabeležen samo sa vaši *Brachyunguis tamaricis* (Petrović et al., 2016), a *E. lonicerae* sa *Hyadaphis foeniculi* (Žikić et al., 2009). Obe vrste poseduju Balkansko rasprostranjenje. Jedinke vrste *E. lonicerae* nisu bile dostupne za molekularne analize.

U ovoj studiji, vrsta *E. persicae* je ispoljila neočekivano visoku varijabilnost haplotipova. Na filogenetskom stablu sekvence su se podelile u dve grupe, od kojih su jednu predstavljale jedinke koje parazitiraju biljne vaši koje kovrdžaju listove biljaka (*Myzus*, *Dysaphis* i *Brachycaudus*) u voćnjacima, a drugu parazitoidi biljnih vaši roda *Aphis*, odnosno domaćina koji ne kovrdža listove. Ovakav podatak dovodi do zaključka da postoji mogućnost da ekologija



domaćina u velikoj meri utiče na evoluciju parazitoida (Pennacchio et al., 1988; Mitrovski-Bogdanović et al., 2013). Međutim, i geografsko poreklo ne može biti isključeno kao faktor divergencije ove dve grupe, s obzirom da je druga *E. persicae* grupa predstavljena jedinkama koje potiču sa Mediterana. Gärdenfors (1986) je u svojoj studiji naveo da se jedinke *E. persicae* koje parazitiraju rod *Aphis*, a sakupljene su u Mediteranskom regionu morfološki razlikuju od ostatka *E. persicae* biotipova. Međutim, Žikić et al. (2009) su sprovedi detaljnu morfološku analizu različitih biotipova *E. persicae* širom Evrope i nisu našli dokaz koji ide u prilog ovoj tvrdnji. Njihovi rezultati su pokazali da je vrsta *E. persicae* morfološki vrlo konzervativna širom Palearktika. Rezultati sadašnje studije, koji na molekularnom nivou pokazuju dve različite genetičke linije vrste *E. persicae*, odstupaju od rezultata Žikić et al. (2009), a potvrđuju rezultate Žikić et al. (2010) koji nagoveštavaju da kod parazitoida koji se razvijaju iz različitih domaćina alometrija evoluirala drugačije, tj. ima različite pravce.

Da genetičke i molekularne razlike nemaju uvek isti stepen poklapanja, potvrđuju i druga istraživanja vrsta potfamilije Aphidiinae. Takav je slučaj kod vrsta roda *Aphidius* (Kos et al., 2011) i *Lysiphlebus* (Petrović et al., 2015).

Razlike u biologiji i ekologiji između populacija *E. persicae* primećene su i u prethodnim istraživanjima. Na primer, poznato je da populacije parazitoida iz severnih delova Palearktika preferiraju domaćine iz tribusa Macrosiphini, kao što su *Dysaphis* i *Myzus*, dok one iz južnog dela Palearktika i Mediterana preferiraju domaćine tribusa Aphidini (*Aphis*, *Brachycaudus*) (Stelfox, 1941; Stary, 1962; Gärdenfors, 1986; Petrović et al., 2016). Ova studija nije mogla da podrži ovu pretpostavku, s obzirom da su se analizirane jedinke parazitoida koji potiču sa biljnih vaši iz različitih tribusa (*Dysaphis*, *Brachycaudus* i *Myzus*) grupisale zajedno na filogenetskom stablu u istu kladu. Studija Petrović et al. (2016) podržava hipotezu da je specijacija unutar potfamilije Aphidiinae pod uticajem biljnih vaši domaćina, s obzirom da su tri vrste unutar podroda *Fovephedrus*, *E. tamaricis*, *E. lonicerae* i *E. chaitophori* usko specijalizovane za jednog domaćina.

Ostatak vrsta klasifikovan je unutar podroda *Ephedrus*, koji se dalje deli na dve grupe vrsta, *plagiator* i *lacertosus*.

*Lacertosus* grupa je u Evropi predstavljena sa dve vrste, *E. lacertosus* i *E. longistigmus*. Dok je prva rasprostranjena širom kontinenta, *E. longistigmus* je zabeležen samo u severnim delovima Evrope: Finskoj (Koponen & Halme, 1993) i evropskom delu Rusije (Davidian, 2018). Sve vrste ove grupe su parazitoidi biljnih vaši iz tribusa Macrosiphini, najčešće rodova *Macrosiphum* i *Amphorophora*, na zeljastim biljkama i žbunovima. Takođe, u literaturi postoji nekoliko zabeleženih asocijacija sa rodom *Myzus*. *Ephedrus lacertosus* preferira šumske ekosisteme (Gärdenfors, 1986). *Ephedrus longistigmus* svoje ime duguje izuzetno dugoj pterostigmi, koja je jedan od glavnih karaktera prilikom identifikacije ove vrste. Mezoskutealna fovea je karakter uvek prisutan kod *E. longistigmus*, dok se kod *E. lacertosus* retko javlja. Iako domaćin vrste *E. longistigmus* nije poznat, postoji nekoliko nalaza sa biljne vaši *Cavariella salicicola*, a koji odgovaraju njenom opisu. Još jedan podatak koji ide u prilog tome da ti nalazi zaista jesu *E. longistigmus*, a ne *E. lacertosus*, kako su prvobitno determinisane jedinke, je taj što nije poznato da *E. lacertosus* napada vaši ovog roda, niti srodne grupe (Gärdenfors, 1986). Prvi nalazi *E. longistigmus* poznati su iz Azije, a Koponen & Halme (1993) i Davidian (2018) pripisuju ovoj vrsti i Evropsko rasprostranjenje.

U okviru *plagiator* grupe, *E. helleni* i *E. validus* pozicionirale su se kao evolutivno udaljene od ostalih. Obe vrste su visoko specijalizovane. *Ephedrus helleni* duž cele svoje distribucije parazitira vaši iz roda *Cavariella* i dodatno *Eumyzus* u Indiji, dok *E. validus* napada vaši iz potfamilije Eriosomatinae koje se hrane na korenu biljaka (Gärdenfors, 1986).

Starý (1958) je vrstu *E. validus* odvojio u zaseban rod, *Lysephedrus*, na osnovu nekoliko morfoloških karaktera, kao što su neuobičajeno naborani propodeum (Slika 24E) i petiolus (Slika 24F) i karakterističan oblik legalice koja je prekrivena gustim setama (Slika 24G). Neki autori su otišli korak dalje, tako da Davidian (2007) tretira *Lysephedrus* kao validni rod. Međutim, s obzirom da je *E. validus* parazitoid vaši koje žive pod zemljom na korenju i proizvode voštane izlučevine, sve ove morfološke karakteristike bi mogle biti objašnjene kao adaptacija na specifičnu podzemnu ekološku nišu. Postoji mogućnost da su se *E. validus* i *E. helleni* odvojile rano od ostalih članova ove grupe, vođene specijalizacijom na određenog domaćina, odnosno tip staništa.

Još jedan dokaz da otkrivanje kriptičnih vrsta unutar velikih kompleksa generalista i dalje nije završeno, je i opisivanje dve nove vrste roda *Ephedrus* – *E. tamaricis* i *E. hyadaphidis*. Dok je vrsta *E. tamaricis* opisana na osnovu jednog nalaza u Sloveniji (Izola), jedinke *E. hyadaphidis* čiji je domaćin bio *Hyadaphis foeniculi*, sakupljene su na nekoliko lokaliteta u Crnoj Gori i Hrvatskoj tokom perioda od 15 godina sa tri različite biljne vrste (*Lonicera xylosteum*, *Sanicula europaea* i *Anthriscus sylvestris*). Svi uzorci vrste *E. hyadaphidis* su sakupljeni na višim nadmorskim visinama (524–1140 mnv) u šumskim ekosistemima.

Postoji mogućnost da je na postojanje ove vrste još ranije ukazano. Gärdenfors (1986) navodi jedinke roda *Ephedrus* sakupljene u Italiji sa *Hyadaphis foeniculi* na *Lonicera etrusca*, koje su u velikoj meri bile slične sa *E. nacheri*, ali sa nekoliko morfoloških karaktera koji odstupaju od opisa te vrste. Navedeni material je neophodno pregledati i ustanoviti da li se radi o vrsti *E. hyadaphidis*.

Pored *E. lonicerae* i *E. tamaricis*, *E. hyadaphidis* predstavlja treću nedavno opisanu vrstu čije je rasprostranjenje Balkansko poluostrvo. Dodatno, Evropske jedinke vrste *E. persicae* se na filogenetskom stablu odvajaju u dve klade, pri čemu jednu formiraju Mediteranski uzorci, a drugu jedinke iz ostatka Evrope. Prosečna genetička distanca između njih iznosi 2,5%, što navodi na zaključak da ove dve grupe odvojeno evoluiraju već neko vreme i da zaslužuju dodatna taksonomska istraživanja. Bogatstvo vrsta čija je distribucija isključivo Balkanski region, kao i bogatstvo haplotipova unutar *E. persicae*, implicira na mogućnost da je Balkan imao značajnu ulogu kao refugijum za vrste roda *Ephedrus* tokom perioda glacijacija.

U ovoj studiji *E. koponeni* je po prvi put pronađen izvan svoje do sada poznate distribucije, Severne Evrope (Finske i evropskog dela Rusije) (Halme, 1992; Davidian, 2018). Jedna ženka sakupljena je u južnoj Srbiji sa domaćina *Cinara* sp. na *Pinus peuce*, reliktnoj i endemskoj vrsti bora sa fragmentisanom distribucijom na Balkanskom poluostrvu. Drugi nalaz ove vrste izvan svog areala zabeležen je sa Stare Planine (Arbinje), sa smrče (*Picea abies*). Postoji mogućnost da su jedinke ove vrste, kada su sporadično sakupljene, pogrešno identifikovane kao *E. plagiator* ili da *E. koponeni* poseduje izuzetno fragmentisanu distribuciju, ograničenu samo na male delove nekada znatno većeg rasprostranjenja.

Na filogenetskom stablu, vrste *E. nacheri*, *E. prociphili* i *E. kopenhageni* grupisale su se zajedno, što se poklapa sa niskim vrednostima genetičkih distanci između njih. Dok su *E. prociphili* i *E. kopenhageni* usko specijalizovane vrste, *E. nacheri* poseduje donekle širi spektar domaćina.

*Ephedrus prociphili* je isključivi parazitoid roda *Prociphilus*, *E. kopenhageni* biljnih vaši četinara, a *E. nacheri* parazitira nekoliko vrsta iz tribusa Aphidini i Macrosiphini, mada je u Evropi najčešće nalažen u asocijaciji sa rodom *Hayhurstia*. Moguće je da se specijacija ove tri vrste tek nedavno dogodila, kada su se odvojile od ostatka *plagiator* grupe, što bi objasnilo niske vrednosti genetičkih distance i morfološku sličnost sa *E. plagiator*.

COI barkoding gen u nekim slučajevima nije informativan. Postoji nekoliko studija koje se bave problemima u oblasti barkodinga (Moritz & Cicero, 2004; Meyer & Pauley, 2005; Jinbo et al., 2011; Wiemers & Fiedler, 2007). Kod određenih beskičmenjačkih grupa COI nije bio uspešan u razdvajanju vrsta i viših taksonomskih nivoa (Dodd, 2004; King et al., 2010; Kaila & Stahls, 2006; Langhoff et al., 2009; Burns et al., 2007; Žurovcova et al., 2010). Takav je slučaj i sa dve analizirane vrste, *E. nacheri* i *E. prociphili*.

Zanimljivo je da je genetička distanca COI između *E. nacheri* i *E. prociphili* 1,1%, što nije uobičajena specijska razlika između vrsta. Međutim, unutar potfamilije Aphidiinae, ponekad se događa da se na osnovu barkoding regiona vrste ne mogu odvojiti. Takav je slučaj i sa vrstama *Lysiphlebus testaceipes* i *L. fritzmuelleri*, kod kojih je genetička distanca takođe 1,1% (Tomanović et al., 2018). Ipak, neophodno je istaći da je distanca EF1 $\alpha$  kod ove dve vrste takođe iznosila 1,1% (uprkos tome što je bilo očekivano da će biti dosta niža jer je u pitanju jedarni gen), dok je između drugih vrsta gde je COI pokazao znatno veće distance, genetička distanca za EF1 $\alpha$  bila niska (na primer, *E. plagiator*–*E. hyadaphidis* 1,4% i *E. niger*–*E. cerasicola* 1,1%). Pored toga, ove dve vrste su specijalizovani parazitoidi rodova biljnih vaši koje nisu srodne i postoje morfološke razlike koje ih mogu diskriminisati. Ovakav rezultat pokazuje da je kombinovana analiza dva ili više molekularnih markera, zajedno sa morfološkim i ekološkim istraživanjem, neophodna prilikom analize bilo koje grupe, u cilju dobijanja pouzdanih rezultata.

*Ephedrus cerasicola* je parazitoid biljnih vaši sa drveća i žbunova, mada se može nešto ređe naći i na zeljastim biljkama (sekundarnim biljkama domaćinima biljnih vaši). Ova vrsta

najčešće parazitira rod *Myzus*, a nakon reklasifikacije *E. dysaphidis* kao mlađeg sinonima *E. cerasicola*, njen čest domaćin je i *Dysaphis*. Ponekad se može naći i na drugim rodovima, kao što su *Brachycaudus*, *Cryptomyzus*, *Phorodon* i *Capitophorus*. Unutar roda *Ephedrus*, ova vrsta je prva po broju uzgajanih jedinki u cilju biološke kontrole biljnih vaši (van Lantern, 2018).

Na filogenetskom stablu, *E. laevicollis* je pozicionirana kao sestrinska vrsta *E. cerasicola*. *Ephedrus laevicollis* je sitna, tamnije obojena vrsta, karakteristična po nedovoljno odvojenim F8 i F9 flagelarnim segmentima. Specijalizovani je parazitoid biljnih vaši koje se nalaze na ružama, a pripadaju tribusu Macrosiphini, dok je najčešće parazitiran rod *Chaetosiphon*.

*Ephedrus niger*, evroazijska vrsta koja preferira vaši rodova *Uroleucon* i *Macrosiphoniella* (Gärdenfors, 1986), lako je prepoznatljiva po crnom telu i karakterističnom suženju u prvoj trećini prvog flagelnog članka. Od ukupno osam jedinki ove vrste koje su korišćene u molekularnoj analizi, detektovano je osam različitih haplotipova koji su činili zasebnu kladu na filogenetskom stablu.

*Ephedrus plagiator* je sigurno najrasprostranjenija vrsta ovog roda širom Evrope. Polifagna je i parazitira preko 100 različitih vrsta biljnih vaši (Gärdenfors, 1986). U ovom radu analizirane jedinke ove vrste sakupljene su sa različitih domaćina (*Aphis* Linnaeus, 1758, *Brachyunguis* Das, 1918, *Sitobion* Mordvilko, 1914, *Rhopalosiphum* Koch, 1854, *Macrosiphum* Oestlund, 1886, *Anoecia* Koch, 1857, *Linosisiphon* Börner, 1944 i *Pterocomma* Buckton, 1879) i biljaka (*Poa*, *Dactylis*, *Malus*, *Tamarix*, *Triticum*, *Sitobion*, *Galium*, *Salix*, *Prenanthes*, *Abies*, *Vicia*, *Ranunculus*, *Prunus*, *Heracleum*) iz različitih tipova staništa. Od ukupno 15 analiziranih sekvenci, detektovano je 8 različitih haplotipova, koji su se svi grupisali u jednu kladu.

Rezultati ove studije ukazuju na to da je filogenija roda *Ephedrus* dosta složenija nego što je prethodno smatrano. Važno je napomenuti da evropske *Ephedrus* vrste čine manje od pola opisanih vrsta ovog roda. U cilju rasvetljavanja filogenetskih odnosa vrsta roda *Ephedrus* i njegove pozicije unutar potfamilije Aphidiinae, neophodna su dodatna istraživanja.

## ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata molekularne i morfološke analize evropskih vrsta roda *Ephedrus*, mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Gen za subjedinicu I citohrom oksidaze *c* se pokazao kao pouzdan molekularni marker u istraživanju filogenije roda *Ephedrus* i detektovanju kriptičnih vrsta. Ovaj region je razdvojio analizirane vrste sa značajnom genetičkom distancom.
2. Jedarni faktor elongacije EF1 $\alpha$  je, i pored veće konzerviranosti u odnosu na COI gen, uspešno razdvojio sve analizirane vrste i dao sličnu topologiju stabla kao i COI barkoding region. Rezultati analize ovog gena potvrđuju da se on može pouzdano koristiti u molekularnim istraživanjima roda *Ephedrus*.
3. Filogenetska analiza je pokazala da tradicionalna podela roda na podrodove *Breviephedrus*, *Lysephedrus* i *Ephedrus* nema podršku i da je neophodna revizija klasifikacije roda. Na osnovu filogenetske i morfološke analize, rod *Ephedrus* se klasifikuje na tri podroda: *Breviephedrus*, *Fovephedrus* i *Ephedrus*.
4. Detektovana je genetička distanca (20,7%) između podrodova *Fovephedrus* i *Ephedrus*. To je ujedno i jedna od najviših vrednosti zabeležena unutar rodova potfamilije Aphidiinae.
5. Vrsta *E. validus* na osnovu rezultata molekularne analize nije imala podršku za odvajanje u zaseban podrod *Lysephedrus*. Shodno tome, podrod *Lysephedrus* je sinonimiziran kao mlađi sinonim podroda *Ephedrus*, a *E. validus* klasifikovan unutar *plagiator* grupe vrsta.
6. Po prvi put je na molekularnom nivou dokazan taksonomski status sledećih vrsta: *E. validus*, *E. koponeni*, *E. laevicollis*, *E. cerasicola*, *E. chaitophori*, *E. prociphili* i *E. brevis*.

7. Vrsta *E. blatnyi*, čiji taksonomski status je i ranije dovođen u pitanje, grupisala se unutar *E. plagiator* vrste sa genetičkom distancom 0,0%–0,7%. Zaključeno je da je *E. blatnyi* samo biotip vrste *E. plagiator*, usled čega je ova vrsta dobila status mlađeg sinonima vrste *E. plagiator*.
8. Vrsta *E. dysaphidis* se na filogenetskom stablu pozicionirala unutar klade *E. cerasicola*, sa genetičkom distancom 0,0%–1,6%. Prilikom morfološkog ispitivanja zaključeno je da se gotovo svi dijagnostički karakteri ove dve vrste preklapaju. *Ephedrus dysaphidis* je sinonimiziran sa *E. cerasicola*, pri čemu se navodi da postoji morfološka varijabilnost između biotipova *E. cerasicola* koji parazitiraju biljne vaši domaćine iz rodova *Dysaphis* i *Myzus*.
9. Na osnovu rezultata molekularne i morfološke analize, opisane su dve vrste nove za nauku: *E. hyadaphidis* Kocić i Tomanović i *E. tamaricis* Petrović i Tomanović.
10. Vrsta *E. kopenhageni* po prvi put je detektovana van poznatog areala, severnog dela Evrope. Sakupljene jedinke ove vrste predstavljaju prve nalaze za faunu Srbije.
11. Unutar *E. persicae* grupe vrsta, utvrđeno je prisustvo dve grupe (mediteranska i kontinentalna) koje se odvajaju sa srednjom genetičkom distancom od 2,2%. Neophodne su dalje studije koje bi se bavile isključivo ovom vrstom.

## Reference

- Akhtar M.S., Rafi U., Usmani M.K., Dey D. (2011) A review of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of Uttar Pradesh and Uttarakhand, India. *BLM*. 3(2):320–323.
- Almohamad R., Hance T. (2014) Encounters with aphid predators or their residues impede searching and oviposition by the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiinae). *Insect Science*. 21: 181–188.
- Austin A., Dowton M. (2000) Hymenoptera: Evolution, biodiversity and biological control. CSIRO. Canberra, 468 pp.
- Autrique A., Starý P., Ntahimpera L. (1989) Biological control of pest aphids by hymenopterous parasitoids in Burundi. *FAO Plant Protection Bulletin*. 37: 71–76.
- Battaglia D., Pennacchio F., Romano A., Tranfaglia A. (1995) The role of physical cues in the regulation of host recognition and acceptance behaviour of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Behaviour*. 8(6): 739–750.
- Belshaw R., Quicke D.L.J. (1997) A molecular phylogeny of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 5: 423–428.
- Belshaw R., Dowton M., Quicke D.L.J., Austin A. (2000) Estimating ancestral geographical distributions: a gondwanan origin for aphid parasitoids? *Proceedings of Royal Society of London*. 267:49–496.
- Belshaw R., Quicke D.L.J. (2002) Robustness of ancestral state estimates: evolution of life history strategy in ichneumonoid parasitoids. *Systematic Biology*. 51:450–477.
- Belshaw R., Grafen A., Quicke D.L.J. (2003) Inferring life history from ovipositor morphology in parasitoid wasps using phylogenetic regression and discriminant analysis. *Zoological Journal of the Linnaean Society*. 139:213–228.
- Bouchard Y., Cloutier C. (1985) Role of olfaction in host finding by aphid parasitoid *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Journal of Chemical Ecology*. 11: 801–808.



- Braimah H., van Emden H.F. (1994) The role of the plant in host acceptance by the parasitoid *Aphidius rhopalosiphi* (Hymenoptera: Braconidae). *Bulletin of Entomological Research*. 84: 303–306.
- Brodeur J., McNeil J.N. (1990) Overwintering microhabitat selection by an endoparasitoid (Hymenoptera: Aphidiidae): induced phototactic and thigmokinetic responses in dying hosts. *Journal of Insect Behavior*. 3: 751–763.
- Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W. (2010) Of many similar species in the Neotropical genus *Porphyrogenes* (Lepidoptera: Hesperidae), a new one, repeatedly reared in Costa Rica, is relatively distinct. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 112: 32–42.
- Caillaud M.C., Losey J.E. (2010) Genetics of color polymorphism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Science*. 10(1): 95.
- Calvert D.J., van den Bosch R. (1972). Behaviour and biology of *Monoctonus paulensis* (Hymenoptera: Braconidae), a parasite of dactynotine aphids. *Annals of Entomological Society of America*. 65: 773–779.
- Carver M., (1989) Biological control of Aphids. In: Minks A.K.& Houtenijn P. (Eds) *Aphids: their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier, New York. 141–165.
- Chaubet B., Derocles S.A.P., Hulle M., LeRalec A., Outreman Y., Simon J.C., Tomanović Ž. (2013) Two new species of aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) from the high arctic (Spitsbergen, Svalbard). *Zoologischer Anzeiger*. 252: 34–40.
- Chen J.H. (1986) *Fovephedrus*, a new genus with four new species (Hymenoptera, Aphidiidae). *Journal of Fujian Agricultural College*. 15: 91–100.
- Chen J.H., Shi Q.X. (2001) *Systematic studies on Aphidiidae of China* (Hymenoptera, Aphidiidae). Fujian Science and Technology Publishing House, Fujian, 273 pp.
- Chen X.X., Piao M.H., Whitfield J.B., He J.H (2003) Phylogenetic relationships within the Rogadinae (Hymenoptera: Braconidae) based on the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Acta Entomologica Sinica*.46: 209–217.

- Cho S., Mitchell A., Regier J.C., Mitter C., Poole R.W., Friedlander T.P., Zhao S. (1995). A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: Elongation factor-1a recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution*. 12: 650–656.
- Chow F.J., Sullivan D.J. (1984) Developmental stages of *Praon pequodorum* Viereck (Hymenoptera: Aphidiidae), a peaaphid parasitoid. *Annals of Entomological Society of America*. 77: 319–322.
- Davidian E.M. (2007) Family Aphidiidae. In: Key to the insects of Russian Far East. 4th ed. Lelej A.S. (Eds). Dal Nauka, Vladivostok. 192–254.
- Davidian E.M. (2018) Check–list of the aphidiid-wasp subfamily Ephedrinae (Hymenoptera, Aphidiidae) from Russia and adjacent countries. *Entomologicheskoe Obozrenie*. 97(4): 740–754.
- De Conti B.F.D., Bueno V.H.P., Sampaio M.V. (2008) The parasitoid *Praon volucre* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) as a potential biological control agent of the aphid *Uroleucon ambrosiae* (Hemiptera: Aphididae) on lettuce in Brazil. *European Journal of Entomology*. 105: 485–487.
- Derocles S.A.P., Le Ralec A., Plantegenest M., Chaubet B., Cruaud C., Cruaud A., Rasplus J.Y. (2012) Identification of molecular markers for DNA barcoding in the Aphidiinae (Hym. Braconidae). *Molecular Ecology Resources*. 12: 197–208.
- Derocles S.A.P., Plantegenest M., Rasplus J.Y., Marie A., Evans D.M., Lunt D.H., Le Ralec A. 2016. Are generalist Aphidiinae (Hym. Braconidae) mostly cryptic species complexes?. *Systematic Entomology*. 106(2):170–180.
- Dieckhoff C., Heimpel G.E. (2010) Role of cuticular hydrocarbons of aphid parasitoids in their relationship to aphid-attending ants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 136: 254–261.
- Dodd C.S. (2004) Development and Optimisation of PCR-Based Techniques in Predator Gut Analysis. PhD Thesis, Cardiff University, Cardiff, UK.

- Dowton M., Austin A.D., Antolin M.F. (1998) Evolutionary relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16S rDNA gene sequences. *Insect Molecular Biology*. 7:129–150.
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. 29: 1969–1973.
- Edson K.M., Vinson S.B. (1979) A comparative morphology of the venom apparatus of female braconids (Hymenoptera: Braconidae). *Canadian Entomologist*. 111: 1013–1024.
- Eijsackers H.J.P., van Lenteren J.C. (1970) Host choice and host discrimination in *Pseudeucoila bochei*. *Netherlands Journal of Zoology*. 20: 414.
- Falabella P., Riviello L., Caccialupi P., Rossodivita T., Teresa-Valente M., Luisa De Stradis M., Tranfaglia A., Varricchio P., Gigliotti S., Graziani F., Malva C., Pennacchio F. (2007) A glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37: 453–465.
- Finlayson T. (1990) The Systematics and taxonomy of final-instar larvae of the family Aphidiidae (Hymenoptera). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 122: 3–74.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294–299.
- Gärdenfors U. (1986) Taxonomic and biological revision of Palearctic *Ephedrus* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Entomologica Scandinavica*. 27: 1–95.
- Gärdenfors U. (1990) *Trioxys apterus* sp.n. from Ecuador, a new wingless species of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Systematics and Evolution*. 21: 67–9.
- Gauld I.D. (1988) Evolutionary patterns of host utilization by ichneumonoid parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae and Braconidae). *Biological Journal of Linnean Society*. 35:351–377.

- Griffiths D.C. (1960) The behaviour and specificity of *Monoctonus paludum* Marshall (Hymenoptera: Braconidae), a parasite of *Nasonovia ribis-nigri* (Mosley) on lettuce. Bulletin of Entomological Research. 51: 303–319.
- Griffiths D.C. (1961) The development of *Monoctonus paludum* Marshall (Hym., Braconidae), a parasite of *Nasonovia ribis-nigri* (Mosley) on lettuce, and immunity reactions in other lettuce aphids. Bulletin of Entomological Research. 52:147–163.
- Hagvar E.B. (1988) Multiparasitism of the green peach aphid, *Myzus persicae*: competition in the egg stage between *Aphidius matricariae* and *Ephedrus cerasicola*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 47: 275–282.
- Hagvar E.B. (1989) Interspecific competition in parasitoids, with implications for biological control. Acta Entomologica Bohemoslovaca. 86: 321–335
- Hagvar E.B., Hofsvang T. (1991) Aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae): biology, host selection, and use in biological control. Biocontrol News and Information. 12: 13–41.
- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: Nucleic Acids Symposium Series No 41. Oxford University Press. 95–98.
- Halme J. (1992) *Ephedrus (Ephedrus) kopenhageni* sp. n. from Finland (Hymenoptera: Braconidae:Aphidiinae). Entomologica Fennica. 31 (3): 113–116.
- Hawkins B.A. (1994) Pattern and process in host-parasitoid interactions. Cambridge University Press.
- Henter H.J., Via S. (1995) The potential for coevolution in a host–parasitoid system. I. Genetic variation within an aphid population in susceptibility to a parasitic wasp. Evolution. 49: 427–38.
- Hirose Y. (2006) Biological control of aphids and coccids: a comparative analysis. Population Ecology.48: 307–15.

- Jinbo U., Kato T., Ito M. (2011) Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*. 14:107–124.
- Jones O.R., Purvis A., Baumgart E., Quicke D.L.J. (2009) Using taxonomic revision data to estimate the geographic and taxonomic distribution of undescribed species richness in the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Insect Conservation and Diversity*. 2:204–212.
- Kaila L., Stahls G. (2006) DNA barcodes evaluating the potential of COI to differentiate closely related species of *Elachista* (Lepidoptera: Gelechioidea: Elachistidae) from Australia, *Zootaxa*. 1170:1–26
- Kambhampati S., Volkl W., Mackauer M. (2000) Phylogenetic relationship among genera of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) based on DNA sequence of the mitochondrial 16S rDNA gene. *Systematic Entomology*. 25: 437–445.
- Kiriak I.G. (1977) The species of *Ephedrus* (Hymenoptera, Aphidiidae) of the USSR. *Izvestia Akademii Nauk Moldavskoi SSR. Seia biologicheskikh i khimicheskikh nauk*. Nomer 5.
- Koponen M., Halme J. (1993) New finds of *Ephedrus* and *Toxares* species (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) from Finland. *Entomologica Fennica*. 4: 31–36.
- Kos K., Petrović A., Starý P., Kavallieratos N.G., Ivanović A., Toševski I., Jakše J., Trdan S., Tomanović Ž. (2011) On the identity of cereal aphid parasitoid wasps *Aphidius uzbekistanicus*, *Aphidius rhopalosiphi* and *Aphidius avenaphis* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) by examination of COI mitochondrial gene, geometric morphometrics and morphology. *Annals of Entomological Sciences of America*. 104(6): 1221–1232.
- Langhoff P., Authier A., Buckley T.R., Dugdale J.S., Rodrigo A., Newcomb R.D. (2009) DNA barcoding of the endemic New Zealand leafroller moth genera, *Ctenopseustis* and *Planotortrix*. *Molecular and Ecological Resources*. 9(3):691–698.
- Latham D.R., Mills N.J. (2010) Life history characteristics of *Aphidius transcaspicus*, a parasitoid of mealy aphids (*Hyalopterus* species). *Biological Control*. 54: 147–52.

- LeRalec A. (1993) Les Hymenopteres Parasitoides: Adaptations del'Appareil Reproducteur Femelle. Morphologie et Ultrastructure de l'Ovarie, de l'Oeuf et de l'Ovopositeur, PhD thesis, Univ. de Rennes I.
- Lewis C.N., Whitfield J.B. (1999) Braconid wasp (Hymenoptera: Braconidae) diversity in forest plots under different silvicultural methods. *Environmental Entomology*. 28: 986–997.
- Liepert C., Dettner K. (1996) Role of cuticular hydrocarbons of aphid parasitoids in their relationship to aphid-attending ants. *Journal of Chemical Ecology*. 22: 695–707.
- Liu S.S., Morton R., Hughes R.D. (1984) Oviposition preferences of a hymenopterous parasite for certain instars of its aphid host. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 35: 249–254.
- Mackauer M. (1961) Die Gattungen der Familie Aphidiidae und ihre verwandtschaftliche Zuordnung (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Beiträge zur Entomologie*. 11: 792–803.
- Mackauer M., Starý P. (1967) World Aphidiidae. In *Index of Entomophagous Insects*. Delluchi V., Remaudiere G. (Eds). Le Francois Paris. 2: 11–195.
- Mackauer M. (1968) *Hymenoptera Catalogus. Pars 3 Aphidiidae*. Dr. W. Junk N.V.
- Mackauer M., Chow F.J. (1986) Parasites and parasite impact on aphid populations. In: *Plant Virus Epidemics: monitoring, modeling and predicting outbreaks*. McLean G.D., Garret R.G. & Ruesink W.G. (Eds). Academic Press. Sydney.
- Mackauer M. (1990) Host discrimination and larval competition in solitary endoparasitoids. In: Mackauer M. (1996) *Sexual size dimorphism in solitary parasitoid wasps: influence of host quality*. *Oikos*. 76: 265–272.
- Mackauer M., Chow F.J. (2012) Facultative gregarious development in a solitary koinobiont parasitoid, *Ephedrus californicus*: implications of larval ecology and host constraints. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 142: 203–210.
- Mackauer M., Finlayson T. (2012) *Choreopraon totarae* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae), a new parasitoid of *Neophyllaphis totarae* (Hemiptera: Aphidoidea: Drepanosiphidae) in New Zealand, *New Zealand Journal of Zoology*. 39: 77–84.

- Meyer C.P., Paulay G. (2005) DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biol* 3(12): e422.
- Michaud J.P., Mackauer M. (1994) The use of visual cues in host evaluation by aphidiid wasps. I. Comparison between three *Aphidius* parasitoids of the pea aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 70: 273–283.
- Michaud J.P., Mackauer M. (1995) The use of visual cues in host evaluation by aphidiid wasps. II. Comparison between *Ephedrus californicus*, *Monotonus paulensis* and *Praon pequodorum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 74: 267–275.
- Ming G., Xia X.M., Xiang-Xiong Z., Cheng D.D. (2003) Developmental stages of *Lysiphlebus japonicus* Ashmead (Hymenoptera: Aphidiidae), a bean aphid parasitoid. *Journal of Entomological Science*. 38: 519–524.
- Mitrović M., Tomanović Ž. (2018) New internal primers targeting short fragments of the mitochondrial COI region for archival specimens from the subfamily Aphidiinae (Hymenoptera, Braconidae). *Journal of Hymenoptera Research*. 64: 191–210
- Mitrović M., Starý P., Jakovljević M., Petrović A., Žikić V., Pérez Hidalgo N., Tomanović Ž. (2019) Integrative taxonomy of root aphid parasitoids from the genus *Paralipsis* (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) with description of new species. *ZooKeys*. 831: 49–69.
- Mitrovski-Bogdanović A., Petrović A., Mitrović M., Ivanović A., Žikić V., Starý P., Vorburger C., Tomanović Ž. (2013) Identification of Two Cryptic Species Within the *Praon abjectum* Group (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) Using Molecular Markers and Geometric Morphometrics. *Annals of the Entomological Society of America*. 106: 170–180.
- Mitsunaga T., Moriya S., Nagasaka K., Hinomoto N. (2015) Host species-dependent and size dependent ecological characteristics of *Ephedrus nacheri* (Hymenoptera: Braconidae). *Applied Entomology and Zoology*. 50(4): 465–475.
- Moritz C., Cicero C. (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biology*. 2:28–39.

- Nyabuga F.N., Outreman Y., Simon J.C., Heckel D.G., Weisser W. (2010) Effects of pea aphid secondary endosymbionts on aphid resistance and development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: a correlative study. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 136: 243–53.
- O'Donnell D.J. (1989) A morphological and taxonomic study of first instar larvae of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Systematic Entomology*. 14: 197–219.
- Oliver K.M., Russell J.A., Moran N.A., Hunter M.S. (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 100: 1803–1807.
- Oliver K.M., Moran N.A., Hunter M.S. (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of Natural Acadacemy of Sciences. USA*. 102: 12795–12800.
- Olkowski W., Olkowski H., van den Bosch R., Hom R., Zuparko R., Klitz W. (1982) The parasitoid *Trioxys tenuicaudus* Stary (Hymenoptera: Aphidiidae) established on the elm aphid *Tinocallis platani* Kaltentbach (Homoptera: Aphididae) in Berkeley, California. *Pan-Pacific Entomologist*.58: 59–63.
- Ortega-Blanco J., Bennett D.J., Declos X., Engel M.S. (2009) A primitive aphidiine wasp in Albian amber from Spain and a Northern Hemisphere origin for the subfamily (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Journal of Kansas Entomological Society*. 82: 273–282.
- Pennacchio F., Gärdenfors U., Tremblay E. (1988) Taxonomic discrimination of males of Palearctic *Ephedrus Haliday* (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Boll. Lab. Agr. Fillipo Silvestri*. 45:181–202.
- Pennacchio F., Fanti P., Falabella P., Digilio M.C., Bisaccia F., Tremblay E. (1999) Development and nutrition of the braconid wasp *Aphidius ervi* in aposymbiotic host aphids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 40: 53–63.



- Persad A.B., Hoy M.A., Nguyen R. (2007) Establishment of *Liplexis oregmae* (Hymenoptera: Aphidiidae) in a classical biological control program directed against the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Florida. *Florida Entomologist*. 90: 204–13.
- Petrović A., Žikić V., Kavallieratos N.G., Stary P., Tomanović Ž. (2013) Barcoding of the genus *Ephedrus* Haliday (Hymenoptera, Braconidae). *Aphidophaga* 2013.
- Petrović A., Mitrović M., Ivanović A., Žikić V., Kavallieratos N.G., Starý P., Mitrovski-Bogdanović A., Tomanović Ž., Vorburger C. (2015) Genetic and morphological variation in sexual and asexual parasitoids of the genus *Lysiphlebus*— an apparent link between wing shape and reproductive mode. *Evolutionary Biology*. 15(5): 1–12.
- Petrović A., Kocić K., Kos K., Plečaš M., Žikić V., Kavallieratos N.G., Tomanović Ž. (2016) High genetic diversity and a new cryptic species within the *Ephedrus persicae* species group (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Biologia*. 71: 1386–1394.
- Pitz K., Dowling A.P.G., Sharanowski B.J., Boring C.A.B., Seltmann K.C., Sharkey M.J. (2007) Phylogenetic relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) as proposed by Shi et al.: a reassessment. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43:338–343.
- Powell W., Pennacchio F., Poppy G.M., Tremblay E. (1998) Strategies involved in the location of hosts by the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Biological Control*. 11: 104–112.
- Price P.W. (1980) *Evolutionary biology of parasites*. Princeton. University Press. 256 pp.
- Quicke D.L.J., van Achterberg C. (1990) Phylogeny of the subfamilies of the family Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Zoologische Verhandelingen*. 258:1–95.
- Quicke D.L.J, Lopez-Vaamonde C., Belshaw R. (1999) The basal Ichneumonidae (Insecta: Hymenoptera): 28S rDNA considerations of the Brachycyrtinae, Labeninae, Paxyloommatinae and Xoridinae. *Zoologica Scripta*. 28: 203–10.
- Quicke D.L.J. (2015) *The Braconid and Ichneumonid parasitoid wasps: biology, systematics, evolution and ecology*. Wiley Blackwell. UK. 744 pp.

- Rambaut A. (2009) FigTree version 1.4.4 <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- Rasekh A., Michaud J.P., Kharazi-Pakdel A., Allahyari H. (2010) Ant mimicry by an aphid parasitoid, *Lysiphlebus fabarum*. Journal of Insect Science.10: 126.
- Rehman A. (1999) The host relationships of aphid parasitoids of the genus *Praon* (Hymenoptera: Aphidiinae) in agro-ecosystems. PhD thesis.University of Reading. UK.
- Rehman A., Powell W. (2010) Host selection behavior of aphid parasitoids (Aphidiidae: Hymenoptera) Journal of plant breeding and crop science. 2(10): 299–311.
- Ripa S.R., Rojas P.S., Velasco G. (1995) Releases of biological control agents of insect pests on Easter Island (Pacific Ocean). Entomophaga. 40: 427–440.
- Sanchis A., Latorre A., Gonzalez-Candelas F., Michelena J.M. (2000) An 18S rDNA-based molecular phylogeny of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). Molecular Phylogenetics and Evolution. 14(2): 180–194.
- Sanchis A., Michelena J.M., Latorre A., Quicke D.L.J., Gärdenfors U., Belshaw R. (2001) The phylogenetic analysis of variable-length sequence data: Elongation factor-1 $\alpha$  introns in European populations of the parasitoid wasp genus *Pauesia* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). Molecular Biology and Evolution. 18: 1117–1131.
- Schlinger E.I. (1974) Continental drift, *Notofagus* (Fagaceae) and some ecologically associated insects. Annual Review of Entomology.19: 323–343.
- Scmidt J.M. (1991) The role of physical factors in tritrophic interactions. Redia. 74: 43–93.
- Sharanowski B. J., Dowling A.P.G., Sharkey M.J. (2011) Molecular phylogenetics of Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea), based on multiple nuclear genes, and implications for classification. Systematic Entomology. 36(3):549–572.
- Sharkey M.J., Wharton R.A. (1997). Morphology and terminology In: Wharton RA, Marsh PM, Sharkey MJ (Eds) Manual of the New World genera of the family Braconidae. International Society of Hymenopterists Special Publication I, Washington, DC. 433 pp.

- Shaw M.R. (1983) One evolution of endoparasitism: the biology of some genera of Rogadinae (Braconidae). Contributions to the American Entomological Institute. 20:307–328.
- Shi M., Chen X.X. (2005) Molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) based on DNA sequences of 16S rRNA, 18S rDNA and ATPase 6 genes. European Journal of Entomology. 102: 133–138.
- Shi M., Chen X.X., van Achterberg C. (2005) Phylogenetic relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16S rDNA, 28S rDNA D2, 18S rDNA gene sequences and morphological characters. Molecular Phylogenetics and Evolution. 37:104–116.
- Smith P.T., Kambhampati S., Volkl W., Mackauer M. (1999) A phylogeny of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) inferred from mitochondrial NADH 1 dehydrogenase gene sequence. Molecular Phylogenetics and Evolution. 11: 236–245.
- Smith P.T., Kambhampati S. (2000) Evolutionary transitions in Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). Hymenoptera. 01:104–111.
- Starý P. (1958) A taxonomic revision of some aphidiine genera with remarks on the subfamily Aphidiinae (Hymenoptera, Braconidae). Acta Faunistica Entomologica Musei Nationalis Pragae. 3: 53–96.
- Starý P. (1962) Notes on the European species of the genus of *Ephedrus* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). Opusc. Entomol. 27: 87–98.
- Starý P. (1970) Biology of aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) with respect to integrated control. Dr W. Junk. The Hague.
- Starý P., Carver M. (1971) A new genus and species of Aphidiidae (Hymenoptera) parasitizing *Sensoriaphis* (Hemiptera) on *Notophagus* in New South Wales. Journal of Australian Entomological Society. 10: 175–178.
- Starý P. (1974) Taxonomy, origin, distribution and host range of *Aphidius* species (Hymenoptera, Aphidiidae) in relation to biological control of the pea aphid in Europe and North America. Zeitschrift für Angewandte Entomologie. 77(2):141–171.

- Starý P. (1975) *Pseudopraon mindariphagum* gen. n., sp. n. (Hymenoptera, Aphidiidae): description and life history of a parasite of *Mindarus abietinus* (Homoptera, Mindaridae) in Central Europe. *Acta Entomologica Bohemoslovaca*. 72: 249–58.
- Starý P. (1976) Aphid parasites (Hymenoptera, Aphidiidae) of the Mediterranean area. Junk Dr. W. (Eds). The Hague. pp 1-95.
- Starý P. (1981) On the strategy, tactics and trends of host specificity evolution in aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*. 78: 65–75.
- Starý P., Rejmanek M. (1981) Number of parasitoids per host in different systematic groups of aphids: the implications for introduction strategy in biological control (Homoptera: Aphidoidea; Hymenoptera: Aphidiidae). *Entomologia Scandinavica*. 15: 341–51.
- Starý P. (1987) Aphid–ant–parasitoid association on the creeping thistle, *Cirsium arvense*, in agroecosystems in Czechoslovakia. *Acta Entomologica Bohemoslovaca*. 84: 15–21.
- Starý P. (1988) Aphids, their biology, natural enemies and control. In Aphidiidae. Minks A.K., Harrewijn P. (Eds.). Elsevier. Amsterdam. pp. 171–184.
- Starý P., Stechmann D.H. (1991) Niche distribution and dispersal of the banana aphid, *Pentalonia nigronervosa* in relation to parasitisation by biocontrol agents (Hom., Aphididae; Hym., Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*. 88: 187–195.
- Starý P., (1993) The fate of released parasitoids (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae) for biological control of aphids in Chile. *Bulletin of Entomological Research*. 83: 633–639.
- Stelfox A.W. (1941) A list of the Irish species of *Toxares* and *Ephedrus* (Hymenoptera: Aphidiidae) with description of these, which include three species new to science. *Proceedings of the Royal Irish Academy*. 46: 125–142.
- Strand M.R. (1986) The physiological interactions of parasitoids with their hosts and their influence on reproductive strategies. In: *Insect parasitoids*. Waage J., Greathead D. (Eds). London. Academic Press.

- Strand M.R. (2000) Developmental traits and life-history evolution in parasitoids. In Parasitoid Population Biology. Hochberg M.E., Ives A.R. (Eds.). Princeton University Press. Princeton. New Jersey. pp. 139-160.
- Strong D.R., Lawton J.H., Southwood R. (1984) Insects on plants. Community patterns and mechanisms. Oxford. Blackwell Scientific. 313 pp.
- Tamura K., Nei M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 512–526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. (2013) MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725–2729.
- Tobias V.I. (1967) A review of the classification, phylogeny and evolution of the family Braconidae (Hymenoptera). *Entomologičeskoe Obozrenie*. 56:646–659.
- Tomanović Ž., Brajković M., Krunić M., Stanisavljević Lj. (1996) Seasonal dynamics, parasitization and colour polymorphism of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Aphididae: Homoptera) on alfalfa in the South part of the Pannonian area. *Tiscia*. 30: 45–48.
- Tomanović Ž. (2000) New findings of aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae) from Serbia and Montenegro. *Acta Entomologica Serbica*. 5(1-2): 111–118.
- Tomanović Ž., Kavallieratos N.G., Starý P., Petrović–Obradović O., Tomanović S., Jovanović S. (2006) Aphids and parasitoids on willows and poplars in southeastern Europe (Homoptera: Aphidoidea; Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae). *Journal of Plant Diseases and Protection*. 113 (4): 174–180.
- Tomanović Ž., Kavallieratos N.G., Starý P., Žikić V., Tomić V., Lučić L. (2007) Redescription of two species of Aphidiinae (Hymenoptera, Braconidae) from high mountain areas of south-eastern Europe, with biological and biogeographical notes on co-occurring guild members. *Entomologica Fennica*. 18: 36–45.
- Tomanović Ž., Bayarslan A., Erdogan Ö.Ç., Žikić V. (2008) New records of aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) from Turkey. *Periodicum Biologorum*. 110(4):

335–338.

- Tomanović Ž., Mitrović M., Petrović A., Kavallieratos N.G., Žikić V., Ivanović A., Rakshani E., Starý P., Vorburger C. (2018) Revision of the European *Lysiphlebus* species (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) on the basis of COI and 28SD2 molecular markers and morphology. *Arthropod Systematics and Phylogeny*. 76(2):179–213.
- Tomić M., Tomanović Ž., Kavallieratos N.G., Starý P., Athanassiou C.G., Tomić V., Lučić L. (2005) Morphological variability of several biotypes of *Ephedrus plagiator* (Nees, 1811) (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) with the description of a new species. *Zoologischer Anzeiger*. 244: 153–162.
- Tremblay E., Calvert D. (1971) Embryo systematics in the aphidiines (Hymenoptera: Braconidae). *Boll. Lab. Entomol. Agrar. Filippo Silvestri. Portici*. 29: 223–249.
- Tremblay E., Pennacchio F., Digilio M.C. (1998) Host regulation effects of ovary fluid and venom of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Physiology*. 44: 779–784.
- Turlings T.C.J., Wackers F., Vet L.E.M., Lewis W.J., Tumlinson J.H. (1993) Learning of host finding cues by hymenopterous parasitoids. In: *Insect learning: ecological and evolutionary perspectives*. Papaj D.P., Lewis A. (Eds). Chapman and Hall. New York. pp. 51–78.
- van Achterberg C. (1997) Revision of the Haliday collection of Braconidae. *Zoologische Verhandelingen*. 314.
- van Alphen J.J.M., Visser M.E. (1990) Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. Academic Press. London.
- van den Bosch R., Messenger P.S., Gutierrez A.P. (1982) *An Introduction to Biological Control*. Plenum Press. New York.
- van Lenteren J.C., Bolckmans K., Köhl J., Ravensberg W.J., Urbaneja A. (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*. 63: 39–59.

- van Steenis M.J. (1994) Intrinsic rate of increase of *Lysiphlebus testaceipes* Cresson (Hymenoptera, Braconidae), a parasitoid of *Aphis gossypii* Glover (Hem, Aphididae) at different temperatures. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*. 118: 399–406.
- Vet L.E.M., Dicke M. (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology*. 37: 141–172.
- Vet L.E.M. (1995) Parasitoid foraging: the importance of variation in individual behavior for population dynamics. In: *Frontiers and applications of population ecology*. Floyd R.B., Sheppard A.W. (Eds). CSIRO. Melbourne.
- Vinson S.B. (1974) The role of the foreign surface and female parasitoid reactions on the immune response of an insect. *Parasitology*. 68: 27–33.
- Vinson F.B. (1976) Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*. 21: 109–133.
- Vinson F.B. (1984) Parasitoid-host relationship. In: *Chemical ecology of insects*. Bell W.J., Carde R.T. (Eds). London. Chapman and Hall.
- Volkl W., Mackauer M. (1993) Interactions between ants attending *Aphis fabae* spp. *cirsiiacanthoidis* on thistles and foraging parasitoid wasps. *Journal of Insect Behavior*. 6: 301–12.
- Volkl W., Mackauer M. (1996) „Sacking“ the host: oviposition behaviour of a parasitoid wasp, *Dyscritulus planiceps* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Journal of Insect Behavior*. 9: 975–980.
- Volkl W., Liepert C., Birnbach R., Hubner G., Dettner K. (1996) Chemical and tactile communication between the root aphid parasitoid *Paralipsis enervis* and the trophobiotic ants: consequences for parasitoid survival. *Experientia*. 52(7): 731–738.
- Volkl W., Novak H. (1997) Foraging behaviour and resource utilization of the aphid parasitoid, *Pauesia pini* (Hymenoptera: Aphidiidae) on spruce: influence of host species and ant attendance. *European Journal of Entomology*. 94: 211–220.

- Volkl W., Mackauer M. (2000) Oviposition behavior of Aphidiinae wasps (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae): Morphological adaptations and evolutionary trends. *The Canadian Entomologist*. 132(2): 197–212.
- Waage J.K., Hassell M.P. (1982) Parasitoids as biological control agents, a fundamental approach. *Parasitology*. 84:241–268.
- Wharton R.A. (1993). Bionomics of the Braconidae. *Annual Review of Entomology*. 38:121–143.
- Whitfield, J.B. 1992. The polyphyletic origin of endoparasitism in the cyclostome lineages of Braconidae (Hymenoptera). *Systematic Entomology*. 17:273–286.
- Wiemers M., Fiedler K. (2007) Does the DNA barcoding gap exist? – A case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*. 4(1):8.
- World Conservation Monitoring Centre. (1992) *Global biodiversity: Status of the Earth's living resources*. London. Chapman & Hall.
- Wyckhuys K.A.G., Koch R.L., Heimpel G.E. (2007) Physical and ant-mediated refuges from parasitism: Implications for non-target effects in biological control. *Biological Control*. 40: 306–313.
- Yu D.S., Horstmann K., van Achterberg C. (2004) *Taxapad 2004: scientific names for information management. Biological and Taxonomical Information: Ichneumonoidea 2004*. CD. Taxapad.Vancouver.
- Yu D.S., van Achterberg C., Horstmann K. (2012) *Taxapad 2012 – World Ichneumonoidea 2011. Taxonomy, biology, morphology and distribution*. On USB flash drive. Ottawa, Ontario, Canada. [www.taxapad.com](http://www.taxapad.com)
- Zaldivar-Riveron A., Mori M., Quicke D.L.J. (2006) Systematics of the cyclostome subfamilies of braconid parasitic wasps (Hymenoptera: Ichneumonoidea): a simultaneous molecular and morphological Bayesian approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 38:130–145.



- Zhang Y., Wyckhuys K.A.G., Asplen M.K., Heimpel G.E., Wu K.M. (2012) Effect of *Binodoxys communis* parasitism on flight behavior of the soybean aphid, *Aphis glycines*. *Biological Control*. 62: 10–15.
- Žikić V. (2008) *Ephedrus persicae* Froggatt kompleks (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) - morfološka i taksonomska studija. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
- Žikić V., Tomanović Ž., Ivanović A., Kavallieratos N.G., Starý P., Stanisavljević Lj., Rakshani E. (2009) Morphological characterization of *Ephedrus persicae* biotypes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in the Palaearctic. *Annals of the Entomological Society of America* 102: 1–11.
- Žikić V., Tomanović Ž., Kavallieratos N.G., Starý P., Ivanović A. (2010) Does allometry account for shape variability in *Ephedrus persicae* Froggatt (Hymenoptera: Braconidae:Aphidiinae) parasitic wasps? *Organisms Diversity and Evolution*. 10 (5): 373–380.
- Žikić V., Stanković S.S., Petrović A., Ilić Milošević M., Tomanović Ž., Klingenberg C.P., Ivanović A. (2017) Evolutionary relationships of wing venation and wing size and shape in Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Organisms Diversity and Evolution*. 17: 607–617.
- Žurovcová M.A., Havelka J., Starý P., Vcchtová P.A., Chundelová D.A. (2010) “DNA barcoding” is of limited value for identifying adelgids (Hemiptera: Adelgidae) but supports traditional morphological taxonomy. *European Journal of Entomology*. 107: 147–156.
- Čapek M. (1970) A new classification of the Braconidae (Hymenoptera) based on the cephalic structures of the final instar larva and biological evidence. *Canadian Entomologist*. 102:846–875.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Korana A. Kocić rođena je 07.01.1988. godine u Beogradu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Beogradu, a 2007. godine upisala Biološki fakultet – Univerzitet u Beogradu, smer Biologija. Diplomirala je 2012. godine, a iste upisala Master studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Zoologija beskičmenjaka i entomologija. Sledeće godine odbranila je uspešno master rad pod nazivom „Kloniranje i sekvenciranje kodirajućih sekvenci gena sekretornih proteina pljuvačnih žlezda krpelja *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758)“.

Nakon završenih master studija, 2014. godine upisala je Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

U periodu 2015–2017 radi kao istraživač pripravnik na Biološkom fakultetu u Beogradu, a zatim od 2017. godine kao istraživač saradnik.

Učestvuje u naučnom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a takođe i u međunarodnim naučnim projektima EKOSTACK i Biodiverzitet Crne Gore. Dobitnik je dva mala projekta Rufford fondacije.

Član je Entomološkog društva Srbije i Srpskog biološkog društva.

Govori i piše engleski jezik, a služi se i ruskim jezikom.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Корана А. Коцић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ Б3024/2014 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларна филогенија, субгенеричка класификација и криптичка специјација европских врста рода *Ephedrus* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 02.10.2019.

Потпис докторанда



---

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Корана А. Коцић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3024/2014 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Молекуларна филогенија, субгенеричка класификација и криптичка специјација европских врста рода *Ephedrus* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ др Жељко Томановић и др Анђељко Петровић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Корана А. Коцић \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, \_\_\_\_\_ 02.10.2019. \_\_\_\_\_

Потпис докторанда



\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекуларна филогенија, субгенеричка класификација и криптичка специјација

---

европских врста рода *Ephedrus* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 02.10.2019.

Потпис докторанда



---

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.