



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
Studijski program Agronomija



MSc Aleksandar Ivezić

IDENTIFIKACIJA PARAZITOIDA KUKURUZNOG PLAMENCA, *Ostrinia
nubilalis* (HÜBNER, 1796), RODA *Trichogramma*, U VOJVODINI

DOKTORSKA DISERTACIJA

MENTOR: Prof. dr. Aleksandra Ignjatović Čupina

NOVI SAD, 2019

Komisija za ocenu i javnu odbranu doktorske disertacije

Dr Aleksandra Ignjatović Čupina, vanredni profesor za užu naučnu oblast Entomologija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet –mentor

Dr Dušan Petrić, redovni profesor za užu naučnu oblast Entomologija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet– predsednik komisije

Dr Željko Tomanović, redovni profesor za užu naučnu oblast Morfologija, sistematika i filogenija životinja, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet – član komisije

Dr Ivana Majić, vanredni profesor za znanstvenu granu Fitomedicina, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Hrvatska– član komisije

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Aleksandar Ivezić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Aleksandra Ignjatović-Ćupina, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Identifikacija parazitoida kukuruznog plamenca, <i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner, 1796), roda <i>Trichogramma</i> , u Vojvodini
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp./eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2019.

Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8
Fizički opis rada: FO	7 poglavlja/106 stranica/6 tabela /4 grafkona/ 72 slike/147 referenci/5 priloga (strane I-XXV)/ biografija/zahvalnica
Naučna oblast: NO	Biotehničke nauke
Naučna disciplina: ND	Entomologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	ITS2, <i>Ostrinia nubilalis</i> , PCR, <i>Trichogramma</i> spp, COI, <i>Wolbachia</i>
UDK	633.15:591.69 (043.3)
Čuva se u: ČU	Biblioteci Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Kukuruz (<i>Zea mays</i> Linnaeus, 1753) predstavlja ekonomski najznačajniju ratarsku kulturu u Srbiji, dok kukuruzni plamenac <i>Ostrinia nubilalis</i> Hübner, 1796 (Lepidoptera: Crambidae) predstavlja najznačajniju štetočinu ove kulture. Redovnim monitoringom populacija kukuruznog plamenca na teritoriji opštine Kikinda (Vojvodina, Srbija) registrovan je visok procenat parazitiranih jajnih legala ove štetočine. Preliminarna identifikacija, sprovedena na osnovu morfoloških karakteristika eklodiranih jedinki, pokazala je da su parazitirana jajna legla kukuruznog plamenca posledica aktivnosti jajnih parazitoida roda <i>Trichogramma</i> Westwood, 1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae).</p> <p>Imajući u vidu da je fauna osica roda <i>Trichogramma</i> u Srbiji nedovoljno istražena, cilj ovog rada je bio je da se izvrši identifikacija autohtonih vrsta roda <i>Trichogramma</i>, parazitoida kukuruznog plamenca na području Vojvodine, kao i utvrđivanje genetičke varijabilnosti u populacijama prisutnih vrsta. Osim toga jedan od ciljeva je bio da se pouzdanim molekularnim metodama u lokalnim populacijama <i>Trichogramma</i> utvrdi prisustvo</p>

endosimbiontske bakterije roda *Wolbachia* Hertig & Wolbach 1924 za koju je poznato da kod *Trichogramma* spp. favorizuje telitoknu partenogenezu.

Monitoring kukuruznog plamenca, koji je sproveden sakupljanjem adulta pomoću svetlosnih klopki na dnevnoj bazi u toku sezone 2016. i 2017. godine na dva odabrana lokaliteta opštine Kikinda, pokazao je da ova štetočina produkuje tri generacije u toku sezone, od kojih je druga generacija, koja se pojavljuje u toku leta najbrojnija i ostvaruje maksimum krajem jula i početkom avgusta. Parazitirana jajna legla su nalažena u periodima koji su odgovarali letu, odnosno ovipoziciji druge i treće generacije kukuruznog plamenca.

U 2016. godini, parazitirana jajna legla plamenca uzorkovana su na pet lokalitetana teritoriji opštine Kikinda (Vojvodina, Srbija): Kinda, Stankić, Banatska Topola, Nakovo i Banatsko Veliko Selo. U zavisnosti od lokaliteta, prosečna stopa parazitiranosti jaja kukuruznog plamenca se kretala u granicama od 51,52% do 84,62%, a u proseku je za istraživano područje iznosila 62,5%. Nakon morfološke identifikacije eklodiranih odraslih jedinki do nivoa roda, osice *Trichogramma* sp. su bile podvrgnute molekularnoj identifikaciji do nivoa vrste, sekvenciranjem ITS2 regiona ribozomske DNK. Rezultati sekvenciranja ITS2 segmenta poređeni su uz pomoć BLAST programa sa poznatim sekvencama u onlajn genbanci *National Center for Biotechnology Information*. Većina identifikovanih jedinki iz uzoraka prikupljenih u 2016. godini je pripadala vrsti *Trichogramma brassicae* Bezdenko, 1968, dok je samo jedna jedinka identifikovana kao *Trichogramma evanescens* Westwood, 1833. Utvrđivanje intraspecijske varijacije uzoraka identifikovanih kao *T. brassicae* sprovedeno amplifikacijom segmenta mitohonrijalne DNK za citohrom c oksidazu I (COI gen) pokazalo je prisustvo 4 haplotipa *T. brassicae* i jednog haplotipa *T. evanescens* u lokalnim populacijama. Testiranje uzoraka osica na endosimbiotsku bakteriju *Wolbachia* Hertig, 1936 korišćenjem prajmera specifičnih za ovu bakteriju (16S i *wsp*) pokazalo je prisustvo ove bakterije u populacijama *T. brassicae* i njenom dominantnom haplotipu (TbSERB-1). Dizajniranjem specifičnih prajmera za amplifikaciju ITS2 segmenta kod *T. brassicae* i *T. evanescens*, sprovedena je Multipleks PCR metoda koja je omogućila identifikaciju ove dve vrste roda *Trichogramma* bez sprovođenja sekvenciranja.

U 2017. godini uzorci su prikupljeni sa 12 lokaliteta u Vojvodini: Mokrin, Idoš, Bašaid, Nakovo, Banatska Topola, Stankić, Njegoševo, Despotovo, Čoka, Senta, Vrbas i Gakovo. Prosečna stopa parazitiranosti jajnih legala kukuruznog plamenca se, u zavisnosti od lokaliteta, kretala u rasponu od 15% do 62,5%, odnosno u proseku za celokupno istraživano područje iznosila je 38,84%. Uzorci odgajanih osica su podvrgnuti su Multipleks PCR

<p>metodi, pri čemu je prisustvo <i>T. brassicae</i> utvrđeno na svim lokalitetima, a <i>T. evanescens</i> samo u uzorcima iz Mokrina i Nakova.</p> <p>Istraživanja u toku 2016. i 2017 godine su pokazala da <i>T. brassicae</i> predstavlja dominantnu vrstu osica parazitoida jajnih legala kukuruznog plamenca na istraživanom području Vojvodine. Razumevanje diverziteta, biologije i ponašanja autohtonih <i>Trichogramma</i> vrsta ključan je korak u potencijalnoj upotrebi ovih parazitoida u biološkoj zaštiti kukuruza i drugih poljoprivrednih kultura u Srbiji.</p>	
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata:</p> <p>DP</p>	
<p>Datum odbrane:</p> <p>DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)</p> <p>KO</p>	<p>Predsednik: Dr Dušan Petrić, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <hr/> <p>Član: Dr Željko Tomanović, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu</p> <hr/> <p>Član: Dr Aleksandra Ignjatović Ćupina, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu– mentor</p> <hr/> <p>Član: Ivana Majić, vanredni profesor, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Hrvatska</p> <hr/>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Aleksandar Ivezić
Mentor: MN	Dr Aleksandra Ignjatović-Ćupina
Title: TI	Identification of <i>Trichogramma</i> egg parasitoids of the European corn borer <i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner, 1796) in Vojvodina (Serbia)
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng./srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher:	Author reprint

PU	
Publication place: PP	Novi Sad
Physical description: PD	7 chapters/ 106 pages/ 6 tables/ 4 graphs/ 72 images /147 references/5 appendices (pages I-XXV) / biography/ acknowledgement
Scientific field SF	Biotechnical sciences
Scientific discipline SD	
Subject, Key words SKW	ITS2, <i>Ostrinia nubilalis</i> , PCR, <i>Trichogramma</i> spp, COI, <i>Wolbachia</i>
UC	633.15:591.69 (043.3)
Holding data: HD	Library of University of Novi Sad, Faculty of Agriculture
Note: N	None
Abstract: AB	<p>Maize (<i>Zea mays</i> Linnaeus, 1753) is the most important cereal crop in Serbia, while the European corn borer (ECB) <i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae) is the major pest of this crop. Regular monitoring of ECB in the region of Kikinda (the province of Vojvodina, Serbia) demonstrated a high percentage of parasitized egg clusters of this pest. Preliminary identification of the egg parasitoids based on morphological traits of emerged adults revealed that they belong to the genus <i>Trichogramma</i> Westwood, 1833 (Hymenoptera, Trichogrammatidae). Considering that the fauna of <i>Trichogramma</i> wasps has not yet been enough explored in Serbia, the objective of this study was to identify the autochthonous species of <i>Trichogramma</i> parasitoids of ECB present in the region of Vojvodina, as well as determining the genetic variability of populations of present species. In addition, one of the objectives of this study was to confirm the presence of endosymbiotic bacteria of the genus <i>Wolbachia</i> Hertig and Wolbach 1924 in native populations of <i>Trichogramma</i> by reliable molecular methods, since it is known that these bacteria induce thelytokous parthenogenesis in <i>Trichogramma</i> species.</p>

Monitoring of ECB adults conducted by light traps on daily basis during the seasons of 2016 and 2017 at two localities in the region of Kikinda demonstrated that this pest produces three generations per year. The second generation of the ECB, which occurs during the summer was the most abundant and peaked in late July and early August. Parasitized egg clusters were found during the period of oviposition of the second and third generation of ECB.

In 2016, parasitized egg clusters were collected at five localities in the region of Kikinda: Kindja, Stankic, Banatska Topola, Nakovo and Banatsko Veliko Selo. Depending on the locality, the average parasitism rate was ranging between 51.52% and 84.62%, while the average parasitism rate for the region was 62.5%. After morphological identification of emerged adults to the genus level, *Trichogramma* sp. wasps were molecularly identified to the species level by sequencing the ITS2 gene of ribosomal DNA. The ITS2 gene was sequenced and subjected to BLAST searches of the GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information). The majority of specimens collected in 2016 were identified as *Trichogramma brassicae* Bezdenko, 1968 and a single specimen as *T. evanescens* Westwood, 1833. Intraspecific variation of samples of wasps was assessed by amplifying the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene. The results showed the presence of 4 haplotypes of *T. brassicae* in local populations, and a single haplotype of *T. evanescens*. Wasps were also tested for the presence of the endosymbiotic bacteria *Wolbachia* using *Wolbachia*-specific 16S and *wsp* primers and the results demonstrated the presence of the bacteria in the population of *T. brassicae* in its dominant haplotype (TbSERB-1). Specific primers for the amplification of ITS2 gene of *T. brassicae* and *T. evanescens* were designed. Using those primers, MultiplexPCR was conducted for identification of the two species without sequencing.

In 2017, samples were collected from 12 localities in Vojvodina province: Mokrin, Idoš, Bašaid, Nakovo, Banatska Topola, Stankić, Njegoševo, Despotovo, Čoka, Senta, Vrbas i Gakovo. Depending on the locality the parasitism rate was between 15% and 62.5%. The average parasitism rate for the entire studied area was 38.84%. Samples of wasps reared from egg clusters sampled in 2017 were subjected to the Multiplex PCR method. *T. brassicae* was determined in samples from all of the localities, while *T. evanescens* was identified only in samples from Mokrin and Nakovo.

The research conducted in Vojvodina during 2016 and 2017 demonstrated that *T. brassicae* represents the dominant parasitoid species of ECB egg clusters. Understanding

of the diversity, biology and behavior of autochthonous *Trichogramma* species is a key step in the potential commercial implementation of these egg parasitoid wasps in biological pest control in Serbia.

Accepted on Senate on:

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

President: Dr Dušan Petrić, full professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

Member: Dr Željko Tomanović, full professor, Faculty of Biology, University of Belgrade

Member: Dr Aleksandra Ignjatović Čupina, associate professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad- mentor

Member: Dr Ivana Majić, associate professor, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, University Josip Juraj Strossmayer of Osijek, Croatia

Zahvalnica

Realizacija ovog rada, u okviru doktorskih studija na Departmanu za fitomedicinu i zaštitu životne sredine Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, izvršena je pod mentorstvom Prof. dr Aleksandre Ignjatović Čupina. Ovom prilikom želim srdačno da se zahvalim svom mentoru na svim savetima koji su mi pomogli u istraživanju, kao i na pomoći pri izboru teme za doktorat, pisanju naučnih radova i realizacije doktorske disertacije.

*U 2017. godini molekularna identifikacije parazitoida iz roda *Trichogramma* izvršena je na Departmanu za entomologiju na Univeritetu Kalifornija u Riversajdu, dok su molekularne procedure tokom 2018. godine sprovedene u laboratoriji Prognozno-izveštajne službe Srbije u Novom Sadu. Veliku zahvalnost dugujem Prof. dr Richard Stauthamer i dr Paul Raugman Jones sa Departmana za entomologiju u Riversajdu na obuci koju su mi pružili, ali i na korisnim sugestijama i odličnoj saradnji. Značajnu pomoć pri ostvarivanju ovog rada pružile su mi i moje kolege Vladislava Nebrigić i Jelena Petrović.*

Veliku zahvalnost dugujem svojim prijateljima i kolegama Meliti Dejanović, Mladenu Đuranu, Draganu Kerkez i Dragani Dragomirov, dok čitav projekat ne bi mogao biti realizovan bez podrške koordinatorke Prognozno-izveštajne službe Srbije dr Dragice Janković. Posebnu zahvalnost želim da izrazim mom velikom prijatelju i duhovnom mentoru Branislavu Trudić, bez čijih saveta, nesebične podrške i ogromne pomoći ne bih uspeo u realizaciji ovog rada. Takođe, neizrecivu podršku i pomoć u svakom smislu pružila mi je moja majka, kojoj u čast i od srca posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

Sadržaj

1. UVOD.....	Error! Bookmark not defined.
1.1. Kukuruzni plamenac - <i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner, 1796)	4
1.1.1 Rasprostranjenost, morfologija i biologija kukuruznog plamenca	4
1.1.2.Štetnost kukuruznog plamenca	7
1.1.3. Prognoza pojave i suzbijanje kukuruznog plamenca	10
1.2 Parazitoidi roda <i>Trichogramma</i>	14
1.2.1. Primena <i>Trichogramma</i> spp u biološkoj borbi protiv štetočina.....	14
1.2.2. Sistematsko mesto i diverzitet faune parazitskih osica roda <i>Trichogramma</i>	18
1.2.3. Biologija i životni ciklus <i>Trichogramma</i> spp	18
1.2.4. Identifikacija <i>Trichogramma</i> spp.....	22
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I RADNA HIPOTEZA	25
3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA.....	27
3.1. Sezonski monitoring <i>Ostrinia nubilalis</i>	27
3.2. Uzorkovanje i skladištenje <i>Trichogramma</i> osica	28
3.3. Morfološka identifikacija <i>Trichogramma</i> parazitoida.....	29
3.4. Molekularna identifikacija uzoraka	39
3.4.1. Molekularna identifikacija uzoraka prikupljenih u 2016. godini.....	39
3.4.1.1. Molekularna identifikacija vrsta roda <i>Trichogramma</i>	39
3.4.1.2. Utvrđivanje genetičke varijabilnosti uzoraka <i>Trichogramma</i> sp	51
3.4.1.3. Identifikacija prisustva <i>Wolbachia</i> bakterije u <i>Trichogramma</i> osicama	52
3.4.2. Molekularna identifikacija uzoraka prikupljenih u 2017. godini.....	54
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	57
4.1. Rezultati monitoringa kukuruznog plamenca na teritoriji Kikinde	57
4.2. Rezultati morfološke i molekularne identifikacije jedinki uzorkovanih u 2016. godini.	60
4.2.1. Specifični prajmeri za identifikovane vrste roda <i>Trichogramma</i>	66
4.2.2. Genetička varijabilnosti uzoraka <i>Trichogramma</i> spp.	69
4.2.3. Prisustvo <i>Wolbachia</i> bakterije u <i>Trichogramma</i> osicama	74
4.3. Rezultati morfološke i molekularne identifikacije jedinki uzorkovanih u 2017.godini.	76
5. DISKUSIJA.....	85
6. ZAKLJUČCI	91
7. LITERATURA.....	94
PRILOZI.....	I-XXV
BIOGRAFIJA	

1. UVOD

Poljoprivredna proizvodnja kao primarna privredna delatnost predstavlja veoma značajan činilac ekonomskog razvoja Republike Srbije. U strukturi srpske poljoprivrede najznačajnije mesto zauzima biljna proizvodnja, koja čini 70% ukupne poljoprivredne proizvodnje (Ilić i sar., 2016). U najznačajnije ratarske kulture spadaju kukuruz, pšenica, suncokret, šećerna repa i soja, pri čemu se kukuruz smatra vodećom ratarskom kulturom u Srbiji. Kukuruz se kod nas svake godine u proseku gaji na oko 1,2-1,4 miliona hektara, dok se ukupni prinos zrna kreće u granicama između 4 i 7 miliona tona godišnje. U svetu je prisutan konstantan trend porasta površina pod kukuruzom uz podizanje nivoa prinosa po jedinici površine (Starčević i sar, 2006). Kukuruz je uz pirinač i pšenicu vodeća poljoprivredna kultura u svetu, a uzgaja se na preko 150 miliona hektara. Najveći proizvođač su Sjedinjene Američke Države sa proizvodnjom od preko 300 miliona tona zrna godišnje i sa prinosom preko 9 tona po hektaru. Najveći deo proizvedenog kukuruza koristi se za ishranu stoke. Za ovu namenu koristi se silaža cijele biljke, silaža vlažnog zrna ili klipa i suvo zrno. Kukuruz se koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji, u proizvodnji bezalkoholnih i alkoholnih pića, te u proizvodnji bio-goriva (Pospišil, 2010).

Proizvodnja kukuruza u Srbiji zadovoljava nacionalne potrebe, ali i obezbeđuje značajne količine kukuruza za izvoz, stoga se ova kultura smatra izvoznim liderom srpske poljoprivrede. U 2015. godini izvezeno je 3 miliona tona kukuruza što je Srbiju svrstalo među 10 najznačajnijih izvoznika ove poljoprivredne kulture (Ilić i sar., 2016). Primarni cilj proizvodnje kukuruza je svakako postizanje visokih i stabilnih prinosa radi ostvarivanja ekonomske dobiti, međutim velike površine pod kukuruzom u našoj zemlji veoma pogoduju masovnom razmnožavanju pojedinih štetočina kukuruza, koje su trofički tesno povezane sa ovim usevom (Ivović, 2015). Kukuruzu Srbiji napada 130 različitih štetnih organizama, a po ukupnoj štetnosti na prvom mestu se nalaze insekti (70%) (Čamprag, 2000).

Iako je proizvodnja kukuruza ugrožena delovanjem brojnih štetnih insekta kao što su kukuruzna zlatica *Diabrotica virgifera* LeConte, 1868 (Coleoptera: Chrysomelidae), pamukova sovica *Helicoverpa armigera*, Hübner 1808 (Lepidoptera: Noctuidae), biljne vaši (Hemiptera: Aphididae), ekonomski najznačajnija štetočina kukuruza u Srbiji je kukuruzni plamenac *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae) (Čamprag i sar., 1983; Čamprag i sar., 2004; Kereši i sar., 2014).

Za konvencionalnu proizvodnju kukuruza karakterističan je visok stepen specijalizacije, mehanizacije i hemizacije. U takvim uslovima konvencionalne biljne proizvodnje, pre svega usled čovekovih aktivnosti, često dolazi do neželjenih pojava kao što su: prenamnožavanje štetočina, parazita, korova, a usled neadekvatne i prekomerne primene pesticida može doći do pojave rezistentnosti štetnih agenasa na pojedine aktivne materije, pojave prekomernih rezidua pesticida u hrani, zagađenja agroekosistema i uništavanja korisnih organizama. Buđenjem ekološke svesti kod potrošača prisutan je sve izraženiji zahtev za proizvodnjom kvalitetne hrane, bez ostataka pesticida i drugih štetnih materija, uz naglašeno korišćenje obnovljivih izvora energije i očuvanje prirodnih resursa i životne sredine. Savremeni trend održive poljoprivredne proizvodnje nameće potrebu izmene tehnološkog procesa proizvodnje uz primenu tehnika koje manje zagađuju životnu sredinu i doprinose dobrom kvalitetu proizvedene hrane. Navedeni zahtevi su u Zapadnoj Evropi i u Severnoj Americi 1975. godine inicirali razvoj novih, alternativnih sistema biljne proizvodnje, a među njima i razvoj integralne proizvodnje ratarskih, povrtarskih i drugih useva. Integralna biljna proizvodnja sadrži sve elemente konvencionalnih sistema biljne proizvodnje, ali se hemijske mere zaštite preporučuju u slučaju kada su iscrpljene sve druge mere u borbi protiv biljnih bolesti, štetočina i korova (Molnar, 2004).

U sistemu integralnog ratarenja veoma važno mesto zauzimaju biološke mere zaštite, koje u savremenoj svetskoj poljoprivredi sve više dobijaju na značaju i baziraju se na upotrebi korisnih insekata (Molnar, 2004). Između štetnih i korisnih organizama postoji prirodna ravnoteža, koja je najčešće nedovoljna za postizanje zadovoljavajućih rezultata u smanjenju brojnosti populacija štetočina u intenzivnom gajenju kulturnog bilja. Stoga se biološka zaštita može definisati kao manipulacija korisnih insekata od strane čoveka u cilju smanjenja populacije poljoprivrednih štetočina (Raspudić i sar., 1999). Jedna od potencijalno uspešnih i ekološki prihvatljivih metoda za biološko suzbijanje kukuruznog plamenca zasniva se na primeni osica iz roda *Trichogramma* Westwood, 1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), koje parazitiraju jajna legla kukuruznog plamenca. Prisustvo ovih korisnih insekata registrovano je u brojnim zemljama širom Mediterana (Silav i sar., 1999; Oztemiz, 2007; Pintureau, 1987), dok je na teritoriji Srbije prisustvo *Trichogramma* parazitoidea zabeleženo u zasadima kupusa, kukuruza šećerca i šumskim ekosistemima (Krnjajić, 2002; Tancik, 2017; Mihajilović, 2018). Tokom sprovođenja programa monitoringa kukuruznog plamenca u periodu od 2010. do 2018. godine u regionu Kikinde (Vojvodina, Srbija), ali i u drugim regionima u Vojvodini (Novi Sad, Vrbas, Senta, Vršac, Zrenjanin, Sombor) registrovan je izrazito visok procenat parazitiranih jajnih legala kukuruznog plamenca (www.pissrbija.com).

Morfološka identifikacija eklodiranih jedinki pokazala je da su parazitirana jajna legla plamenca posledica aktivnosti parazitoidnih osica iz roda *Trichogramma* (www.pissrbija.com). U Srbiji do sada nije detaljna izvršena inventarizacija vrsta *Trichogramma* u prirodnim populacijama, što u velikoj meri limitira potencijal primene ovih osica u biološkoj borbi protiv poljoprivrednih štetočina.

Za identifikaciju vrsta iz roda *Trichogramma* primenjuju se morfološke i molekularne tehnike. Morfološka identifikacija je prvobitno bila jedini način za identifikaciju ovih osica. Izrazito male dimenzije i varijabilnost morfoloških karakteristika kod vrsta iz roda *Trichogramma* vrlo često uzrokuju greške u identifikaciji vrsta, čineći morfološku metodu identifikacije nepouzdanom. Otkrićem i primenom molekularnih tehnika, proces identifikacije *Trichogramma* parazitoida značajno je olakšan. Takođe, molekularna identifikacija omogućila je značajan napredak u taksonomiji ovih organizama, jer su zahvaljujući molekularnim analizama otkriveni brojni propusti u sistematici i identifikaciji ovih insekata.

Visoka stopa parazitizma koja odlikuje autohtone populacije *Trichogramma* parazitoida na teritoriji Srbije je potencijal koji se nikako ne sme zanemariti. Stoga bi ove osice, ali i brojni drugi korisni insekti koji su prisutni na teritoriji Srbije, morali pronaći svoje mesto u komercijalnoj upotrebi, odnosno u masovnoj proizvodnji i primeni u biološkoj borbi protiv štetnih insekata. *Trichogramma* parazitoidi spadaju u grupu korisnih insekata sa najširoom praktičnom primenom i koriste se širom sveta za suzbijanje brojnih štetnih Lepidoptera. Ipak, jedan od ključnih uslova za uspešnu primenu ovih organizama u praksi jeste izbor adekvatne *Trichogramma* vrste, jer različite vrste preferiraju različita staništa, domaćine i uslove sredine. Efikasnost upotrebljenih parazitoida se značajno poboljšava izborom vrste koja je najbolje prilagođena specifičnom usevu i domaćinu (Knutson, 1998). Stoga, prvi neophodni korak za uspešnu implementaciju *Trichogramma* parazitoida u programima biološke zaštite kukuruza od štetnih Lepidoptera je identifikacija prirodnih *Trichogramma* populacija, ali i razumevanje njihove biologije, pošto su autohtone populacije parazitoida vrlo često najbolje prilagođene uslovima životne sredine i specifičnostima ekosistema (Whitman i Nordlund, 1994).

1.1. Kukuruzni plamenac - *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796)

1.1.1. Rasprostranjenost, morfologija i biologija kukuruznog plamenca

Kukuruzni plamenac, je izrazito polifagna štetočina u proizvodnim regijama kukuruza severne Zemljine polulopte (Popović i sar., 2015). Prisustvo ovog insekta u entomofauni je utvrđeno oko 1500. godine (Bethenod i sar., 2005). Kao ekonomski značajna štetočina kukuruza, vrsta se prvi put pominje 1835. godine (Coffrey i Worthley, 1972). Do danas su identifikovane 224 biljke u statusu hranidbenog i reproduktivnog domaćina kukuruznog plamenca (Lewis, 1975; Ponsard i sar., 2004). Na teritoriji Severne Amerike, prisustvo ove štetočine je utvrđeno dvadesetih godina XX veka, nakon ponovljenog uvoza sirka metlaša (*Sorghum vulgare*) iz Mađarske, Austrije i Italije u periodu od 1909 do 1914. godine (Smith, 1920).

Kao pripadnik grupe Holometabola, kukuruzni plamenac ima potpuni preobražaj, odnosno tokom razvića prolazi kroz četiri razvojna stadijuma: jaje, larva (gusenica), lutka i imago (leptir). Leptiri kukuruzovog plamenca se u našem podneblju pojavljuju od maja do oktobra i aktivni su tokom noći i u zoru (Čamprag i sar., 1983). Adulti žive u proseku 10 dana (Hill, 1987), a visoka vlažnost vazduha i dodatna ishrana povećavaju fertilitet i životni vek imaga (Leahy i Andow, 1994). Kukuruzni plamenac se odlikuje polnim dimorfizmom, pri čemu su ženke krupnije i svetlije od mužjaka (Beck, 1987).

Ženka ima raspon krila od 25 do 30 mm i njena krila su svetložute do svetlosmeđe boje (Slika 1). Mužjak ima tamnija, sivosmeđa ili smeđa krila, a raspon krila je od 20 do 25 mm (Slika 2).



Slika 1. Ženka kukuruznog plamenca (Foto: Ivezić, 2015)



Slika 2. Mužjak kukuruznog plamenca (Foto: Jezerkić, 2013)

Gusenica je najpre belo-ružičaste boje, a tokom razvoja poprima prljavo sivu ili žućkasto-smeđu boju (Slika 3). Na dorzalnoj strani svakog segmenta nalaze se četiri okruglaste tamne pege, a iz njih izbija po jedna dlačica. U toku razvića telo gusenice naraste do 25 mm (Maceljski, 2002).

Jaja su sitna (prečnika 0,5 mm) i bivaju položena u jajnim leglima (Slika 4.), najčešće sa donje strane lista biljke hraniteljke, pri čemu jedno jajno leglo može sadržati od 15 do 45 jaja (Čamprag i sar., 1983). Embrionalni razvoj traje 5-7 dana, nakon čega se ispile larve. Zavisno od vegetativnog perioda, larve se hrane na različitim delovima kukuruza. Larve se presvlače 4 puta, prolazeći kroz 5 larvenih stupnjeva, označenih sa L1 do L5 (Slika 5), a prezimljavaju u najstarijem larvenom uzrastu (L5) u stablu blizu korena. Tokom zimske dijapauze (hibernacije), larve nakupljaju glicerol i razvijaju tolerantnost na niske temperature. Prema Nordin i sar. (1984), pad temperature vazduha u jesenjem periodu verovatno indukuje rast koncentracije glicerola u hemolimfi.

Tokom hibernacije gusenice se ne hrane, a ukupna aktivnost metabolizma je svedena na minimum (hipometabolizam). Na proleće dolazi do pada koncentracije glicerola u telu larve. Rast temperature zemljišta uslovljava prekid dijapauze i nastavak razvića, odnosno formiranje stadijuma lutke (Slika 6) i pojavu imaga prve generacije (Popović i sar., 2015). Lutka je smeđe boje, kod mužjaka je dužine oko 14 mm i širine tela oko 2,5 mm, dok je lutka ženke nešto krupnija (Vukašinović, 2014).



Slika 3. Larva kukuruznog plamenca (Preuzeto sa: <http://www.omafra.gov.on.ca/ipm/english/peppers/insects/eurpean-corn-borer.html>)



Slika 4. Jajno leglo kukuruznog plamenca (Foto: Durutović, 2016)



Slika 5. Pet stupnjeva razvoja larvi kukuruznog plamenca (Preuzeto sa: <https://www.cornpest.ca/photo-gallery/european-corn-borer-ecb/>)



Slika 6. Lutka kukuruznog plamenca (Foto: Sarajlić, 2013)

U godinama masovne pojave i promena u voltinizmu, vrsta predstavlja najznačajniju štetocinu u usevu kukuruza i limitirajući faktor u postizanju željenih prinosa. (Popović i sar., 2015).

Broj generacija kukuruznog plamenca varira zavisno od proizvodne regije kukuruza, vegetacije, agrometeoroloških uslova, sortimenta i tehnologije gajenja (Bača i sar., 2002). U severnijim područjima plamenac ima samo jednu generaciju (univoltni), a u južnim i 3 do 4 generacije (multivoltni) (Maceljski, 2002). Na Evropskom kontinentu tokom sedamdesetih godina XX veka potisnuta je dominacija univoltnog, te danas prevladava bivoltni tip štetocine (Nagy, 1993). Hadžistević (1983) navodi da se na našim prostorima ova vrsta odlikuje sa jednom dominantnom generacijom, dok Bača (2007) ukazuje na dve generacije štetocine godišnje. Prema novijim podacima Prognozno-izveštajne službe Srbije, rezultati praćenja dinamike leta plamenca svetlosnim klopama postavljanim na većem broju lokaliteta u periodu od maja do oktobra meseca, pokazali su da vrsta na teritoriji Vojvodine produkuje 3 generacije godišnje (www.pissrbija.com). Brojnost populacija kukuruznog plamenca na teritoriji Srbije je varijabilna i zavisi pre svega od vremenskih uslova i gustine populacije u prethodnoj godini. Podaci Prognozno-izveštajne službe Srbije o prosečnoj brojnosti adulta u svetlosnim klopama, u Vojvodini se u periodu od 2010. do 2018. godine ukazuju na porast brojnosti populacija ove štetocine (www.pissrbija.com).

1.1.2. Štetnost kukuruznog plamenca

Kukuruzni plamenac glavne štete pričinjava u stadijumu gusenice, koje uzrokuju oštećenja na klip, stabljici i listovima kukuruza značajno smanjujući kvantitet i kvalitet

prinosa (Godfrey i sar., 1991). Gusenice prve generacije se prvo hrane mladim lišćem izgrizajući male otvore (Slika 7), a zatim se ubušuju u stabljiku gde buše hodnike, (Slika 8 i 9) i u zavisnosti od vegetativnog perioda, odnosno fenofaze razvoja kukuruza, mogu se naći na različitoj visini biljke. Gusenice druge i treće generacije su takođe endofitne i ubušuju se direktno u klip (Slika 10).



Slika 7. Oštećenja na listovima kukuruza (Foto: Ivezić, 2017)



Slika 8. Larva kukuruznog plamenca u stabljici kukuruza (Foto: Majić, 2008)



Slika 9. Crvotočina nastabljici kukuruza (Foto: Majić, 2008)



Slika 10. Oštećenja od plamenca i *Fusarium* spp. na klipovima kukuruza (Foto: Gašpar, 2016)

Napad se lako prepoznaje po crvotočini koju gusenica izbacuje pri ubušivanju u nadzemne delove biljke (Slika 9 i 10). Na napadnutim biljkama dolazi do lomljenja metlice, lomljenja stabla i opadanja klipova. Klipovi na polomljenim stabljikama, kao i klipovi koji su otpali, predstavljaju direktne gubitke u uslovima mehanizovane berbe (Čamprag i sar., 1983). Gusenica kukuruznog plamenca ishranom uzrokuje niz fizioloških poremećaja: redukciju fotosinteze i transpiracije, smanjenu koncentraciju ugljendioksida u međucelijskim prostorima, povećanu temperaturu lista, poremećaje u transportu vode kroz biljku (Godfrey i sar., 1991). Osim toga, oštećenja koja uzrokuju gusenice predstavljaju ulazna vrata za prodor

patogena (*Fusarium* spp, *Penicilium* spp, *Aspergillus* spp i dr), izazivača bolesti stabljike i klipa (Slika 10). Sva navedena oštećenja smanjuju produktivnost useva i direktno se odražavaju na visinu i kvalitet prinosa (Čamprag i sar., 1983). Kao izrazito polifagna štetočina kukuruzni plamenac oštećuje i krompir. Anderson i sar. (1981) navode da plamenac sa krompira na kukuruz može preneti bakteriju *Erwinia carotvora* Smith, prouzrokovavača bolesti crne noge krompira.

Literaturni podaci ukazuju na različitu štetnost kukuruznog plamenca u zavisnosti od uticaja vegetacije, agrometeoroloških uslova, sortimenta i tehnologije gajenja. Popović i saradnici (2015) navode da nivo ekonomskih gubitaka u godišnjoj proizvodnji varira od 0 do 100%. Prema podacima Jovanića (1969) kukuruzni plamenca utiče na smanjenje prinosa kukuruza od 2% do 25%, dok Manninger (1968) navodi da prisustvo samo jedne larve *O. nubilalis* u kukuruzu smanjuje produktivnost biljke za 2 do 6%. Ovaj insekt je 1963. godine u Vojvodini uzrokovao smanjenje prinosa za 10 do 15% (Čamprag, 2002), a u Hrvatskoj za 6 do 25% (Bažok i Igrc-Barčić, 2010). U Poljskoj je tokom trogodišnjeg monitoringa (2008.-2010.) utvrđeno da se prinos kukuruza šećerca umanjio od 34,7% do 66,7%, a prinos merkantilnog kukuruza od 29,7% do 52,5% (Bereš, 2012). Hugger (1998) ukazuje da 1 larva po biljci uzrokuje pad prinosa za 4%, te da ekonomski prag štetnosti iznosi 10 jajnih legala ili 60-80 larvi na 100 biljaka. Glavni proizvodni regioni kukuruza u našoj zemlji su Vojvodina i Pomoravlje. Upravo su u ovim regionima štete od plamenca najevidentnije, što se objašnjava konstantnim porastom površina pod kukuruzom, redukovanom agrotehnikom, nekontrolisanom i neadekvatnom hemijskom zaštitom. Značaj kukuruznog plamenca je globalnog karaktera, jer je njegov štetan uticaj evidentan u svim delovima sveta u kojima se kukuruz proizvodi (Čamprag i sar., 1983).

1.1.3. Prognoza pojave i suzbijanje kukuruznog plamenca

Prognoza i utvrđivanje optimalnog momenta za sprovođenje preventivnih ili kurativnih mera u cilju kontrole kukuruznog plamenca veoma je kompleksan zadatak koji predstavlja elementarni preduslov uspešne zaštite kukuruza. Za postizanje željenih ciljeva neophodno je poznavanje biologije štetočine, ali i uticaja svih faktora spoljašnje sredine koji su specifični za određen ekosistem. U praksi se za monitoring kukuruznog plamenca i predviđanje pojave određenih razvojnih stadijuma najčešće koriste sledeće metode: vizuelni pregled biljaka kukuruza radi utvrđivanja broja položenih jajnih legala i broja tek ispiljenih gusenica, zatim svetlosne klopke i feromonske klopke za praćenje pojave i leta imaga, a kao

bitni parametri za predviđanje pojave leta leptira razmatraju se i meteorološki podaci, pre svega temperatura vazduha. Feromonske klopke za kukuruznog plamenca zasad još ne daju dovoljno pouzdane podatke o letu odraslih mužjaka. Utvrđeno je da postoje dve "feromonske rase" kukuruznog plamenca, rase E i Z, te hibrid ovih rasa (E/Z). Ove feromonske rase se odlikuju različitim odnosom cis i trans izomera seksualnog feromona ženki (Maceljski, 2002).

U praksi se za suzbijanje kukuruznog plamenca sprovode sledeće mere:

- Agrotehničke/mehaničke
- Biotehničke (genetičke)
- Hemijske
- Biološke

Agrotehničke i mehaničke metode, te uzgoj otpornih hibrida ubrajaju se u grupu preventivnih mera, a biološke, biotehničke i hemijske metode u grupu kurativnih mera (Pavić, 2016).

Elementarna agrotehnička mera pri proizvodnji kukuruza je svakako pravilan plodored. Optimalna rotacija useva je temelj uspešne zaštite, jer gajenje u monokulturi povećava populaciju kukuruznog plamenca, ali i brojnih drugih štetočina kukuruza. Izmena kultura na određenoj površini smanjuje broj štetnih i istovremeno povećati broj korisnih organizama (Pavić, 2016).

Pored plodoreda eventualne štete od kukuruznog plamenca se mogu smanjiti pomeranjem datuma setve kukuruza (rok setve), te uništavanjem drugih potencijalnih domaćina, npr. korova (Maceljski, 2002). U agrotehničke mere spada i mehanička obrada zemljišta radi uništavanja žetvenih ostataka u kojima prezimljavaju gusenice. Nakon berbe kukuruza žetvene ostatke je neophodno usitniti i duboko zaorati. Kukuruzovina ostavljena na površini tla ili samo delimično prekrivena zemljom izvor je infestacije i za sva susedna polja (Pavić, 2016).

Nisu svi hibridi kukuruza podjednako atraktivni za ovu štetočinu, pa se pravilnim izborom hibrida može smanjiti potencijalna šteta. Pojedini hibridi kukuruza zbog maljavog lišća nisu atraktivni ženka za polaganje jaja, zatim hemijski sastav određenih hibrida kukuruza uzrokuje veću smrtnost gusenica od drugih (npr. na biljkama sa manje belančevina smrtnost mladih gusenica je veća), a određeni hibridi kukuruza podnose veći broj gusenica po biljci bez značajnog sniženja prinosa, stabljika im je čvrsta i teže se lomi (Raspudić i sar., 1999).

Značajna biotehnička mera u suzbijanju kukuruznog plamenca podrazumeva upotrebu genetski modifikovanog kukuruza, otpornog na različite patogene, štetočine i pesticide. Sa aspekta zaštite kukuruza od *O. nubilalis* od posebnog značaja su Bt hibridi kukuruza. Takve biljke nose naziv "insekticidne biljke". Bt kukuruz je genetski modifikovan hibrid, koji sadrži gen za proizvodnju endotoksina bakterije *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915). Gusenice kukuruznog plamenca prilikom ishrane na ovakvim biljkama u crevni trakt unose endotoksin, što uslovljava prestanak ishrane i uginjavanje gusenica (Bronnen, 2004). Genetski modifikovani hibridi sve više se primenjuju na tržištu naručito u SAD-u, Kanadi i Kini dok se na tlu Evrope slabije gaje, uglavnom u istraživačke svrhe.

Maceljski (2002) iznosi da bi se uobičajene štete od kukuruznog plamenca mogle prepoloviti pridržavanjem navedene tri preventivne mere, odnosno plodoredom, rigoroznim mehaničkim merama suzbijanja i forsiranjem setve otpornih i tolerantnih hibrida.

Hemijske metode suzbijanja kukuruznog plamenca se najčešće sprovode kao kurativne mere (primena u vegetaciji). Kurativna primena insekticida odnosi se na primenu u momentu dok se gusenice još nisu ubušile u stabljiku kukuruza (Pavić, 2016). Hemijsko suzbijanje *O. nubilalis* u kukuruzu predstavlja veoma zahtevan zadatak, jer efikasnost tretmana zavisi od više činilaca.

Najčešći faktori koji otežavaju hemijsko suzbijanje plamenca i smanjuju efikasnost primenjenih insekticida su:

- razvučen let imaga
- preklapanje generacija kukuruznog plamenca
- dug period ovipozicije ženki
- kratak period izloženosti gusenica hemijskim sredstvima
- otežana primena mehanizacije u punoj vegetaciji

U konvencionalnoj proizvodnji kukuruza, efekat pomenutih faktora se eliminiše većim brojem hemijskih tretmana, što se protivi osnovnim načelima integralne zaštite bilja. Ključ uspeha za postizanje visoke efikasnosti primenjenih insekticida podrazumeva određivanje adekvatnog momenta primene. Insekticidni tretmani mogu obezbediti efikasno suzbijanje plamenca i drugih štetočina kukuruza, ali se kao posledica upotrebe hemijskih sredstava negativno deluje na prirodne neprijatelje, kao što su predatori i parazitoidi. Pored toga, ostaci insekticida se zadržavaju u prirodnoj sredini, zagađuju podzemne i površinske vode, akumuliraju se u poljoprivrednim proizvodima i štete flori i mikrofauni (Edwards, 1986). Da bi se nekontrolisana upotreba insekticida izbegla, hemijske mere treba kombinovati sa drugim

merama borbe, pre svega biološkim. Takođe, za uspešnu zaštitu neophodno je odabrati i odgovarajući insekticid. Pored uticaja insekticida na ciljnu štetočinu treba sagledati i uticaj primenjenog sredstva na korisne insekte. Otežavajuće okolnosti koje limitiraju efekte hemijskog suzbijanja kukuruznog plamenca, podstakle su razvoj drugih strategija za kontrolu ove štetne vrste. Odgovor hemijske industrije na savremene zahteve tržišta stigao je plasmanom insekticida iz grupe regulatora razvića insekata, koji inhibiraju biosintezu hitina i ometaju fiziološke procese kod štetnih insekata. Ovi proizvodi pokazuju izrazito visoku toksičnost prema štetnim insektima, ali su bezbedni za mnoge korisne insekte (Hiemstra i sar. 1999).

Biološke metode se odnose na primenu prirodnih neprijatelja ili bioinsekticida. Prema načinu ishrane prirodni neprijatelji mogu biti predatori, parazitoidi i patogeni (prouzrokovajući bolesti). Kukuruzni plamenac ima veliki broj prirodnih neprijatelja, kako predatora, tako i parazitoida i patogena. Od predatora najznačajnije su stenice rodova *Orius* (Wolff, 1811) (Heteroptera: Anthocoridae) i *Nabis* (Latreille, 1802) (Heteroptera: Nabidae), larve zlatooka (Neuroptera: Chrysopidae) i bubamare (Coleoptera: Coccinellidae), koje se hrane jajima i mladim gusenicama. U najčešće parazitoide ubrajaju se opnokrilci (Hymenoptera) i dvokrilci (Diptera), od kojih su najvažniji parazitoidi jaja, osice iz roda *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) i parazitoidi gusenica, kao što su muve guseničarke *Lydella thompsoni* (Herting, 1959) i *Lespesia* spp. (Diptera: Tachinidae). Gusenice kukuruznog plamenca oboljevaju i uginjavaju usled infekcije entomopatogenih gljiva kao što su vrste iz roda *Beauveria* (Vuill, 1912) (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Metarhizium* (Sorokin, 1883) (Hypocreales: Clavicipitaceae), entomopatogenih bakterija i virusa (Vajgand, 2014). Prvo biološko suzbijanje kukuruznog plamenca na teritoriji biše Jugoslavije sproveo je Hergula 1929 godine u Zagrebu primenom bakterije *Bacillus thuringiensis*, a 1930. godine i pomoću gljive *Metarhizium anisopliae* (Sorokin, 1883), ali uprkos dobrim postignutim rezultatima ove metode biološke borbe nisu dugi niz godina primenjivane u praksi (Pavić, 2016). Koriste se i bioinsekticidi na bazi bakterije *B. thuringiensis* var. kurstaki sa zadovoljavajućim uspehom suzbijanja koji se kreće od 70% do 90% (Maceljski, 2002).

Suzbijanje kukuruznog plamenca je veoma zahtevan postupak i sve pomenute metode je neophodno sprovoditi racionalno i u adekvatnom vremenskom periodu kako bi se kvantitativni i kvalitativni gubici u prinosu sveli na minimum. Pored postizanja kvalitetnih prinosa i ostvarivanja ekonomske dobiti, neophodno je zadovoljiti brojne kriterijume savremenog tržišta. Sa jedne strane, očekuje se efikasna zaštita useva od poljoprivrednih štetočina, što često podrazumeva nekontrolisanu upotrebu hemijskih sredstava, dok se sa

druge strane teži proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane sa što manje toksičnih rezidua. Kako bi se svi kriterijumi tržišta zadovoljili, neophodno je sprovođenje određenih promena u tradicionalnim metodama zaštite bilja. Savremena poljoprivreda i rastuća ekološka svest favorizuju integralnu proizvodnju kukuruza i biološku zaštitu useva, jer suzbijanje biljnih štetočina upotrebom korisnih insekata i bioinsekticida eliminiše određene štetne efekte konvencionalne poljoprivredne proizvodnje. Glavni faktor koji inicira ovakve promene je negativan uticaj hemijskih sredstava na životnu sredinu, kao i njihov kumulativan efekat. Integralni pristup, zasnovan na kombinovanoj primeni različitih metoda zaštite bilja, zahteva visok stepen znanja kako o poljoprivredi tako i o genetici, ekonomiji i ekologiji, te se mora odvijati pod kontrolom stručnih lica (Raspudić i sar., 2013). Ipak, rastom ekološke svesti, biološke mere suzbijanja kukuruznog plamenca zasnovane na komercijalnoj upotrebi korisnih insekata se sve više favorizuju i dobijaju na značaju. Sa aspekta biološke zaštite svakako najširu primenu u praksi imaju osice iz roda *Trichogramma* (Knutson, 1998).

1.2 Parazitoidi roda *Trichogramma*

1.2.1. Primena *Trichogramma* spp. u biološkoj borbi protiv štetočina

Sa aspekta biološke borbe, vrste iz roda *Trichogramma* predstavljaju najvažnije jajne parazitoide štetnih Lepidoptera. Veliki broj naučnih radova je objavljen o *Trichogramma* vrstama, pa se ove osice i mogu slobodno svrstati među najproučavanije korisne insekte na svetu (Knutson, 1998). Već na samom početku 20. veka pojedini biolozi su prepoznali potencijal ovih insekata u biološkoj borbi i od tada se mnoge *Trichogramma* vrste uspešno primenjuju suzbijanju brojnih štetočina, te danas gotovo da ne postoje korisni insekti sa širom primenom od osica iz roda *Trichogramma* (Li, 1994). Osnovni razlog masovne primene *Trichogramma* vrsta proizilazi iz njihove visoke efikasnosti pri suzbijanju štetnih insekata i relativno jednostavnog uzgoja u laboratorijskim uslovima. Podjednako bitna činjenica koja favorizuje primenu ovih parazitoida je prisutnost različitih *Trichogramma* vrsta u različitim ekosistemima i upravo se prirodnim/nativnim populacijama najčešće daje prednost pri izboru odgovarajuće vrste parazitoida za komercijalnu upotrebu i augmentaciju (Nordlund, 1994).

Veoma je teško proceniti tačnu površinu poljoprivrednog zemljišta koja se svake godine tretira ovim korisnim insektima. Hassan (1997) i Van Lenteren (2000) navode da se preko 16 miliona hektara poljoprivrednog zemljišta tretira sa vrstama iz roda *Trichogramma*, dok Smith (1996) procenjuje upotrebu *Trichogramma* vrsta na 32 miliona hektara. Iako

procena o praktičnoj primeni *Trichogramma* parazitoida varira od autora do autora, prisutan je konstantan porast zemalja, kako u Evropi tako i u Aziji i Americi, u kojima se uspostavlja ovakav način zaštite useva i vrši masovno gajenje korisnih insekata namenjenih komercijalnoj upotrebi (Van Lenteren i Bueno, 2003).

Vrste iz roda *Trichogramma* najčešće parazitiraju jaja Lepidoptera. Međutim, pojedine vrste parazitiraju i jaja Coleoptera, Heteroptera, pa čak i nekih Hymenoptera (Maceljski, 2002). Jajni parazitoidi iz roda *Trichogramma* se već duže od 120 godina uspešno koriste u biološkoj borbi brojnih štetnih Lepidoptera (Smith, 1996; Van Lenteren, 2000), dok je njihova primena za suzbijanje kukuruznog plamenca postala opšte prihvaćena širom sveta (Hassan, 1981). Poznato je bar pet praktično primenjivanih *Trichogramma* vrsta (*T. evanescens* Westwood, 1833; *T. brassicae* Bezdenko, 1968; *T. ostriniae* Pang and Chen, 1974; *T. dendrolimi* Matsumura, 1926, *T. nubilale* Ertle and Davis, 1975) koje su pokazale značajnu efikasnost u suzbijanju kukuruznog plamenca i njegove srodne vrste, orijentalnog kukuruznog plamenca, *Ostrinia furnacalis* (Guenée, 1854) (Wang i sar., 1999). Na evropskom tlu, najširu primenu u suzbijanju kukuruznog plamenca pronašla je vrsta *T. evanescens*, čija je upotreba zabeležena u zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza (Beglyarov i Smitnik, 1977) i u Nemačkoj (Hassan, 1993), dok je vrsta *T. brassicae* (syn. *T. maidis* Pintureau and Voegelé, 1980) primenjivana za suzbijanje plamenca u drugim evropskim zemljama kao što su Švajcarska (Bigler, 1986), Francuska, Italija, Austija i Holandija (Van Schelt i Ravensberg, 1991).

Prema navodima pojedinih autora (DeBach i Hagen, 1964; Van Driesche i Bellows, 1996), u biološkoj kontroli poljoprivrednih štetočina zastupljena su tri opšta pristupa:

- introdukcija prirodnih neprijatelja
- augmentacija
- konzervacija korisnih insekata.

Introdukcija prirodnih neprijatelja podrazumeva unošenje novih korisnih vrsta insekata na neko područje radi suzbijanja određenih štetnih vrsta. Augmentacija obuhvata aktivnosti kojima se populacija korisnih insekata uvećava povremenom proizvodnjom (produkcijom), periodičnim ispuštanjem (inokulativno ili inundaciono) i kolonizacijom na one površine na kojima je povećana populacija štetnih organizama. Inokulativni pristup se primenjuje radi kolonizacije prirodnih neprijatelja u određen usev na početku vegetativne sezone sa ciljem da potomstvo apliciranih jedinki kontroliše populaciju štetnih insekata u dužem vremenskom periodu. Inundacioni pristup podrazumeva aplikaciju korisnih insekata u momentu kada se želi postići trenutačno suzbijanje određenog štetnog organizma, pri čemu štetočinu direktno suzbijaju aplicirane jedinice, a ne njihovo potomstvo (Rechcigl i Rechcigl, 2000).

Pored inundacionog i inokulativnog pristupa, uspešna komercijalna upotreba korisnih insekata zahteva i očuvanje (konzervaciju) već prisutne prirodne populacije parazitoida. Konzervacija postojeće populacije zasniva se na primeni različitih mera koje omogućavaju očuvanje ili poboljšanje uslova za razvoj već postojećih prirodnih neprijatelja na određenom staništu. Postupci augmetacije i konzervacije autohtonih vrsta korisnih insekata podrazumevaju sistematsko povećavanje populacije već prisutnih vrsta u određenom ekosistemu, odnosno očuvanje postojeće populacije korisnih insekata eliminacijom svih faktora koji korisnim insektima onemogućavaju da realizuju svoj pun potencijal (Rechcigl i Rechcigl, 2000). Jedan od bitnih preduslova uspešne implementacije različitih strategija biološke borbe jeste očuvanje prirodnog staništa i biološke raznolikosti. U vezi sa tim, neophodno je definisati i kontrolisati uticaj antropogenog faktora na prirodnu sredinu i biodiverzitet korisnih insekata (Rechcigl i Rechcigl, 2000).

Trichogramma vrste koje potiču iz različitih ekosistema se razlikuju po brojnim karakteristikama, pa samim tim i po potencijalu u biološkoj borbi. Dobra strategija pri izboru adekvatne vrste podrazumeva poređenje svih raspoloživih vrsta o kojima postoje literalni podaci, radi izbora najadekvatnije *Trichogramma* vrste za date uslove sredine. Efikasnost domaćih i introdukovanih *Trichogramma* vrsta najpre treba proveriti kroz laboratorijske eksperimente, a zatim njihovu efikasnost u biološkoj kontroli treba ispitati u polukontrolisanim i prirodnim uslovima. Takođe, učinkovitost svake primenjene aplikacije parazitoida treba redovno pratiti i procenjivati. Brojne osobine korisnih insekata iz roda *Trichogramma* su izučavane kako bi se unapredile strategije biološke kontrole, kao što su: sposobnost pronalaska domaćina, disperzija populacije, procenat eklozije imaga, procenat vitalnih ženki, let, sposobnost kretanja i brzina hodanja (Burbutis i sar., 1977; Kot, 1979; Greenberg, 1991; Kazmer i Luck, 1995; Cerutti i Bigler, 1995; Drost i sar., 2000; Suverkropp i sar., 2001).

Prema Knutsonu (1998) veću efikasnost parazitoida u prirodnim uslovima obezbeđuje:

- Razvoj metoda za masovnu proizvodnju, koji će obezbediti konstantan prinos visoko kvalitetnih parazitoida.
- Razumevanja kvantitativne veze između broja apliciranih parazitoida i njihovog uticaja na populaciju štetnih insekata.
- Razumevanje uticaja prirodne sredine i pojedinih useva na aktivnost i efikasnost korisnih insekata.
- Upotreba najpogodnijih vrsta ili formi parazitoida za aplikaciju.

- Određivanje optimalne veličine areala za distribuciju parazitoida.
- Razvijanje proizvodnog sistema koji onemogućava ili ograničava uticaj insekticida na prirodne neprijatelje.
- Definisane ograničavajućih faktora za njihovo skladištenje, transport i aplikaciju u usevima.

Održavanje visoke populacije parazitnih osica, kao metod biološke borbe, podrazumeva poljoprivrednu praksu koja će sačuvati prirodne neprijatelje (konzervacija) i pospešiti njihov uticaj na štetočine. Ovakav pristup zaštiti kukuruza podrazumeva upotrebu selektivnih insekticida koji ne deluju na korisne insekte, kao i podizanje zaštitnih pojaseva koji će obezbediti hranu i stanište za korisne insekte. Insekticidi na bazi *Bacillus thuringiensis* i aktivne materije kao što je hlorantraniliprol (Coragen) imaju vrlo mali uticaj na osice iz roda *Trichogramma* i mogu se uspešno koristiti prilikom ovakvog načina biološke zaštite. U suprotnom, upotreba neselektivnih insekticida pored štetnog organizma uništava i korisne insekte, pa samim tim njihov doprinos u očuvanju korisne entomofaune izostaje (Knutson, 1998). Jedna od institucija, koja podstiče implementaciju bioloških mera zaštite je Međunarodna organizacija za biološku kontrolu (IOBC – International organization for biological control). U cilju sprovođenja biološke zaštite kukuruza kao mere integralnog programa zaštite neophodno je razviti odgovarajuće protokole za komercijalni uzgoj i praktičnu primenu *Trichogramma* osica, jer jedino takav odgovoran pristup poljoprivrednoj proizvodnji obezbeđuje optimalne uslove za efikasnu primenu parazitoida, s ciljem da korisni insekti u potpunosti budu prilagođeni uslovima sredine i samim tim obezbede visok nivo efikasnosti.

Pored brojnih prednosti biološke kontrole, komercijalna primena korisnih insekata nije široko rasprostranjena. Razlog tome je prvenstveno visoka cena proizvodnje komercijalnih parazitoida, koja bi još više povećala već visoku cenu proizvodnje kukuruza, pogotovo šećerca. Bouse i Morrison (1995) navode da bi parazitne osice bile konkurentne hemijskoj zaštiti i da bi pronašle širu upotrebu u praksi ukoliko bi se cena koštanja proizvodnje parazitoida smanjila za 40%, a efikasnost povećala na 60 - 80%. Za postizanje zadovoljavajućih rezultata biološkom kontrolom poljoprivrednih štetočina, od velike važnosti je uspostavljanje konstantnog povećanja efikasnosti primenjenih parazitoida. Napori za uzgoj efikasnijih formi parazitoida su u tom slučaju i više nego opravdani (Hassan, 1994).

1.2.2. Sistematsko mesto i diverzitet faune parazitskih osica roda *Trichogramma*

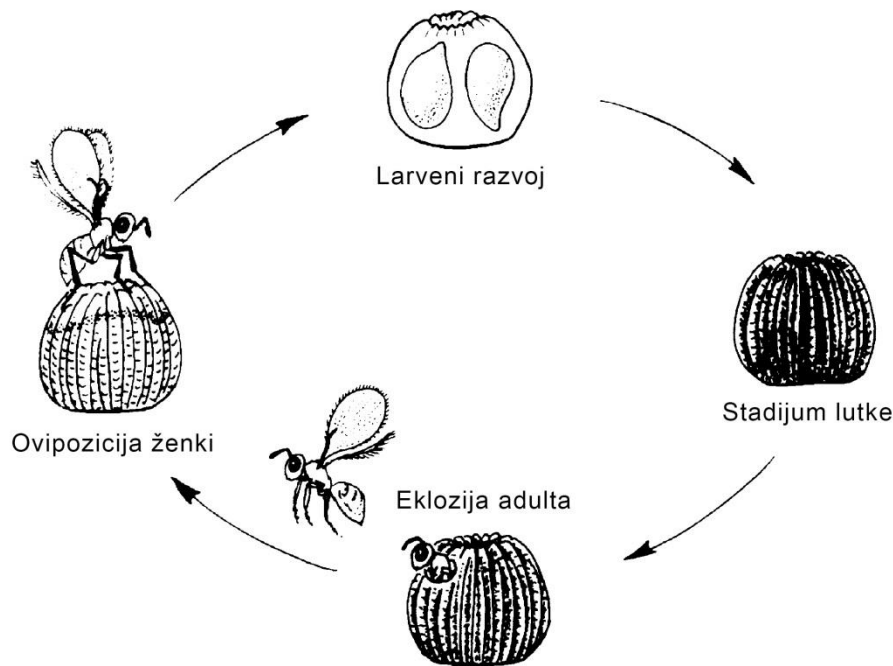
Parazitne osice iz roda *Trichogramma* pripadaju redu Hymenoptera, nadfamiliji Chalcidoidea i familiji Trichogrammatidae. Familija Trichogrammatidae obuhvata 80 rodova i oko 640 vrsta, a u okviru roda *Trichogramma* u svetu postoji 210 opisanih vrsta (Pinto, 2006). Samo je na teritoriji Severne Amerike identifikovano 60 vrsta iz roda *Trichogramma*, na teritoriji Centralne Amerike 21 vrsta, dok je u Južnoj Americi utvrđeno prisustvo 41 vrste ovog roda (Zucchi i sar., 2010). Na Evropskom tlu identifikovano je 40 vrsta iz roda *Trichogramma* uz konstantnu identifikaciju novih vrsta (Pintureau i sar., 2000), od kojih najširu primenu u biološkoj kontroli imaju: *Trichogramma cacoeciae* Marchal, 1927, *T. brassicae*, *T. dendrolimi* i *T. evanescens* (EPPO, 2002). Na teritoriji Srbije praćenjem dinamike kupusne sovice *Mamestra brassicae* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Noctuidae) i monitoringom kukuruza šećerca identifikovano je prisustvo vrste *T. evanescens* (Krnjajić, 2002; Tancik, 2017), dok Mihajlović (2016) navodi *Trichogramma cacoeciae viridanae* Mihajlović kao vrlo efikasnu vrstu u suzbijanju zelenog hrastovog savijača *Tortrix viridana* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Tortricidae) u šumarstvu.

1.2.3. Biologija i životni ciklus *Trichogramma* spp.

Osice iz roda *Trichogramma* su polifagni endoparaziti insekata (parazitoidi) koji se razvijaju u svom domaćinu. Sve vrste iz ovog roda spadaju u grupu parazitoida koji parazitiraju jaja drugih insekata (Slika 11). Za ove parazitoide je karakteristično da isključivo stadijum larve vodi parazitski život i upravo larva ubija svog domaćina. Ono što odlikuje sve *Trichogramma* vrste su izrazito sitne dimenzije tela. Dužina tela adulta varira od 0,2 mm do 1,5 mm, dok teže svega 8 µg, što u velikoj meri otežava njihovu morfološku identifikaciju (Silva i sar., 1999a).

Pri pronalaženju jajeta domaćina u koje će položiti svoje jaje, odrasla ženka osice se orijentiše pomoću hemijske i vizuelne percepcije stimulusa koji su poreklom od domaćina i koji na osicu deluju kao atraktanti. Ženka domaćina prilikom ovipozicije luči određenu količinu kairomona, a upravo ova jedinjenja (mirisi domaćina) su hemijski atraktanti koji privlače osicu ka jajima domaćina (Nordlund, 1981), dok su oblik i boja jaja domaćina vizuelni atraktanti za vrste iz roda *Trichogramma* (Ruberson i sar., 1993). Kada ženka osice locira jaje domaćina, legalicom pravi otvor na horionu i polaže svoje jaje unutar jajeta domaćina, pri čemu iz otvora na jajetu domaćina istekne određena količina vitelusa, kojim se

ženka osice hrani. Ruberson i saradnici (1993) ističu da ishrana vitelusom parazitiranog jajeta produžava životni vek ženke.



Slika 11. Životni ciklus osice *Trichogramma* sp. (Preuzeto sa: <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf104.html>)

Broj jaja koje ženka *Trichogramma* sp. položi u jedno jaje domaćina varira od veličine jajeta domaćina i kreće se u rasponu od 1 do 4. Za ove vrste nije karakterističan superparazitizam, te ženke *Trichogramma* nisu sklone ovipoziciji u već parazitirana jaja domaćina (Hajek, 2004). Ipak, parazitiranje istog jajnog legla domaćina od strane više *Trichogramma* vrsta nije retka pojava kod ovih insekata (Huigens i Stouthamer, 2003)

Tokom ovipozicije ženka *Trichogramma* osice u jaje domaćina ispušta otrov, koji razgrađuje vitelus i embrion parazitiranog jajeta, stoga sadržaj parazitiranog jajeta biva razgrađen pre piljenja larvi parazitoida. Larve parazitoida se pile u roku od 24 sata nakon ovipozicije i tokom razvića prolaze kroz tri larvena stupnja (Strand, 1986). Tokom poslednjeg larvenog stupnja pigment melanin se deponuje na horionu jajeta domaćina i parazitirana jaja dobijaju karakterističnu crnu boju po kojoj se veoma lako razlikuju od neparazitiranih jaja (Slika 12). Larva trećeg stupnja prelazi u stadijum lutke, a nakon 4-5 dana formira se imago (Slika 13), koji progriza otvor na horionu i napušta parazitirano jaje (Strand, 1986) (Slika 14). Male dimenzije tela, kao i realne poteškoće u istraživanjima biologije osica roda *Trichogramma* izazvale su neslaganja autora čak i oko broja larvenih stupnjeva. Flanders

(1937) i Curtis (1940) navode da rod *Trichogramma* ima 3 larvena stupnja, dok Pak i saradnici (1982) tvrde da postoje četiri larvena stupnja.



Slika 12. Parazitirano jajno leglo kukuruznog plamenca (Foto: Vidić, 2014)



Slika 13. Imago *Trichogramma* sp. (Foto: Jezerkić, 2014)



Slika 14. Napušteno parazitirano jajno leglo kukuruznog plamenca (foto: Sarajlić, 2010)

Alkarrat (2013) navodi da vrste iz roda *Trichogramma* ciklus razvića završavaju za 10 dana pri temperaturi od $25 \pm 1^\circ\text{C}$. U laboratorijskim uslovima ženka parazitira, odnosno izvrši ovipoziciju u jedno do 10 jaja domaćina dnevno, a čak do 190 tokom životnog veka (Ruberson i sar., 1993). Isti autori tvrde da krupnije ženke parazitiraju više jaja od sitnijih ženki, ali i da sveže položena jaja domaćina više pogoduju razvoju parazitoida te su podložnija napadu. *Trichogramma* ženke vrlo retko parazitiraju jaja u kojima je došlo do diferenciranja larve domaćina, jer je pod takvim okolnostima stopa preživljavanja larvi parazitoida vrlo niska (Ruberson i sar., 1993).

Trichogramma parazitoidi uglavnom prezimljavaju u larvenom stadijumu u jajetu domaćina. Određene vrste prezimljavaju u stadijumu lutke kako bi preživele duži period pod niskim temperaturama (Lopez i sar., 1980). Najznačajniji faktor spoljašnje sredine koji utiče na ulazak u zimsku dijapauzu (hibernaciju) kod *Trichogramma* parazitoida je niska temperatura (Boivin, 1994). Pored temperature, dijapauzu može indukovati fotoperiod i način ishrane (Alkarrat, 2013). Istraživanje perioda mirovanja vrsta iz roda *Trichogramma* privlači veliku pažnju istraživača, usled činjenice da su ovi organizmi ne samo široko primenjeni u biološkom suzbijanju raznih poljoprivrednih štetočina, već i važni predstavnici brojnih prirodnih biocenoza (Boivin, 1994; Smith, 1996).

Kao predstavnici reda Hymenoptera, *Trichogramma* vrste predstavljaju haplo-diploidne organizme. Za većinu predstavnika reda Hymenoptera pored seksualne reprodukcije karakteristično je partenogenetsko razmnožavanje, odnosno razmnožavanje bez oplodnje. Najzastupljeniji oblik partenogeneze je arenotokna partenogeneza. Pri ovakvom načinu razmnožavanja iz neoplođenih jaja razvijaju se haploidni mužjaci, dok se iz oplodjenih jaja razvijaju diploidne ženke. Ipak, među pojedinim predstavnicima ovog reda prisutna je i telitokna partenogeneza koja se karakteriše produkcijom diploidnih ženki iz neoplođenih jaja (Luck i sar., 1992). Telitoknom partenogenezom ove vrste mogu da produkuju veliki broj generacija u potpunom odsustvu mužjaka i seksualne reprodukcije. Telitokna partenogeneza nije retka pojava kod predstavnika iz roda *Trichogramma*. Pinto i Stauthamer (1994) navode da postoji bar 14 *Trichogramma* vrsta kod kojih su zabeležene telitokne forme.

Prema navodima Stouthamer (1997) telitokna partenogeneza kod *Trichogramma* se najčešće povezuje sa prisustvom endosimbiotske bakterije *Wolbachia*. *Wolbachia* je alfa proteobakterija koja je široko rasprostranjena i prisutna je u mnogim insekatskim vrstama. Prenosi se tranovariolno (citoplazmom jajeta) i utiče na reproduktivne procese domaćina na različite načine (O' Neill i sar., 1992; Werren i sar., 1995). De Almeida (2004) navodi da je registrovano 17 *Trichogramma* vrsta kod kojih je utvrđeno prisustvo *Wolbachia* bakterije.

Među registrovanim *Trichogramma* vrstama najčešći oblik reproduktivne modifikacije indukovan ovom bakterijom je upravo telitokna partenogeneza (de Almeida, 2004). U haplo-diploidnim *Trichogramma* osicama, cito-genetički mehanizam *Wolbachia*-indukovane partenogeneze je poznat i kao duplikacija gameta (Stouthamer, 1997). Normalna mejoza je praćena spajanjem dva jedra tokom prve mitotičke deobe što obnavlja diploidnost (Stouthamer & Kazmer 1994). Ovakva pojava vrlo učinkovito čini potomstvo homozigotnimna svim lokusima u genomu (Stouthamer, 1997).

Prenos bakterije je vertikalalan i vrši se sa zaražene ženke na potomstvo, dok mužjaci ne prenose *Wolbachia* bakteriju na svoje potomstvo (Huigens i Stouthamer, 2003). Kod *Trichogramma* vrsta ova endosimbiotska bakterija može uticati na fekunditet i dugovečnost adulta, ali može povećati i mortalitet larvi (Stouthamer i Luck, 1993). Telitokna partenogeneza kod *Trichogramma* spp. je zabeležena i pri potpunom odsustvu *Wolbachia* bakterije, što implicira da ovaj oblik partenogeneze kod *Trichogramma* spp. ne mora uvek biti posledica infekcije ovom bakterijom (de Almeida i Stouthamer, 2003). Sa aspekta efikasnosti *Trichogramma* parazitoida u biološkoj borbi protiv štetočina, telitokna partenogeneza indukovana *Wolbachia* bakterijom pokazuje izvesne prednosti. Telitokne linije parazitoida odlikuju manji troškovi laboratorijskog gajenja, jer se produkcijom diploidnih telitoknih ženki isključuje produkcija mužjaka, nepotrebnih u biološkom suzbijanju poljoprivrednih štetočina (Silva i sar., 1999b).

1.2.4. Identifikacija *Trichogramma* spp.

Izrazito male dimenzije vrsta iz roda *Trichogramma* (<1 mm) kao i nedostatak pouzdanih morfoloških karakteristika otežavanju određivanje taksonomske pripadnosti i ispravnu identifikaciju vrsta (Stouthamer i sar., 1999). U okviru pojedinih vrsta ovog roda postoji veliki broj rasa i ekotipova koji su morfološki veoma slični, ali se mogu razlikovati po biološkom ciklusu, fiziološkim osobinama i prema spektru domaćina (Krnjajić, 2002). Za morfološku identifikaciju ovih osica postoji svega nekoliko pouzdanih morfoloških karaktera, a sam postupak determinacije vrsta baziran na morfologiji predstavlja dugoročan proces koji zahteva specijalizovano znanje i veliko iskustvo (Nagaratti i Nagaraja, 1968; Nagaratti i Nagaraja, 1971; Pinto i Stouthamer, 2002). *Trichogramma* vrste su u prošlosti prvenstveno determinisane na osnovu boje tela i rasporeda seta. Pošto je vrlo brzo utvrđena varijabilnost pomenutih morfoloških karakteristika unutar istih *Trichogramma* vrsta, Flanders i Quednau (1960) primenjuju metodu, baziranu na ideji Howard i Fiske (1911), po kojoj se morfološka

identifikacija vrsta roda *Trichogramma* odvija uz prethodno gajenje u striktno kontrolisanim laboratorijskim uslovima kako bi se eliminisao uticaj spoljašnjih faktora na posmatrane morfološke karakteristike. Metoda je počivala na pogrešnoj pretpostavci da u rodu *Trichogramma* postoji svega 6 vrsta. Razvojem pouzdanijih tehnika za identifikaciju, determinisan je znatno veći broj vrsta (≈ 200) (Pinto, 1999), te je metoda Flanders i Quednau postala nedovoljno pouzdana u identifikaciji vrsta roda *Trichogramma*.

Značajan korak u taksonomiji ovih insekata postignut je zahvaljujući Nagaratti i Nagaraja (1968; 1971) koji su uočili specifičnosti u morfološkoj građi genitalija mužjaka kod pojedinih vrsta iz roda *Trichogramma*.

Na osnovu razlike u građi genitalija mužjaka, Nagaraja i Nagaratti (1971) su 36 do tada poznatih vrsta *Trichogrammas* vrstali u 9 grupa:

- Australicum
- Minutum
- Euproctidis
- Flandersi
- Japonicum
- Agriae
- Malybyi
- Parkeri
- Achae

Iako je ovo otkriće predstavljalo veliki napredak u taksonomiji i omogućilo identifikaciju brojnih *Trichogramma* vrsta, ova metoda je vremenski veoma zahtevna i podrazumeva posedovanje specijalizovanih veština determinacije. Takođe, značajan nedostatak ove metode leži u činjenici da se ovim postupkom mogu identifikovati samo mužjaci, što predstavlja značajan limitirajući faktor s obzirom da se u prirodi vrlo često registuju telitokne partenogenetske forme među kojima nema mužjaka ili su mužjaci vrlo retki (Stouthamer i sar., 1999). Greške u identifikaciji vrsta često su uzrokovale upotrebu neadekvatnih *Trichogramma* vrsta u komercijalne svrhe što je značajno smanjivalo efikasnost primenjenih parazitoida i onemogućilo postizanje željenih rezultata (Stauthamer i sar., 1999). Brojne vrste roda *Trichogramma*, ako ne i sve, pokazuju veoma izraženu sklonost ka specifičnim staništima (Nordlund, 1994), pa je izbor odgovarajuće vrste ključan u postupcima primene biološke borbe (Stauthamer i sar., 1999).

Komplikovana morfološka identifikacija vrsta iz roda *Trichogramma* značajno je olakšana primenom molekularnih metoda koje omogućavaju pouzdaniju i rutinski izvodljivu identifikaciju ovih insekata. Uvođenjem molekularnih metoda, identifikacija vrsta iz roda *Trichogramma* se prvenstveno bazira na analizi DNK sekvenci i na genetičkom mapiranju pomoću RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) markera (Laurent i sar., 1996). Kod *Trichogramma* vrsta ribozomska DNK se sastoji od tri visoko konzervirana regiona koji kodiraju ribozomsku RNK, a međusobno su razdvojeni sa dva interna transkripciona spejsera (ITS1 i ITS2). Stouthamer je sa svojim saradnicima (1999) prvi utvrdio praktičnu primenu DNK sekvenci internog transkripcionog spejsera 2 (ITS2) u postupcima molekularne identifikacije vrsta iz roda *Trichogramma*. ITS2 je intron, nekodirajući deo ribozomske DNK (rDNK) i ovaj region se uspešno koristi za identifikaciju i karakterizaciju vrsta iz roda *Trichogramma* (Pinto i sar., 2002). ITS2 region je visoko specifičan za vrste iz roda *Trichogramma*, odnosno veoma je konzerviran unutar iste vrste i značajno varira između različitih *Trichogramma* vrsta (Sumer i sar., 2009).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJAI RADNA HIPOTEZA

Imajući u vidu terenske observacije u usevima kukuruza na teritoriji Vojvodine u toku poslednjih nekoliko godina, koje su ukazale na postojanje visoke stope parazitiranosti jajnih legala kukuruznog plamenca od strane osica roda *Trichogramma*, kao i činjenicu da je u Srbiji fauna osica ovog roda nedovoljno istražena, cilj ovog istraživanja bio je da se izvrši identifikacija vrsta jajnih parazitoida kukuruznog plamenca iz roda *Trichogramma* na teritoriji Vojvodine, uzorkovanih tokom 2016. i 2017. godine.

S obzirom da, prema literaturnim podacima, različiti genotipovi u okviru istih vrsta roda *Trichogramma* pokazuju različite performanse sa aspekta uzgoja i stope parazitizma, cilj ovog rada je takođe bio da se utvrdi postojanje intraspecijske varijacije unutar pojedinih vrsta osica koje potiču sa različitih lokaliteta u Vojvodini.

Pored toga, imajući u vidu da bakterije roda *Wolbachia* spp. indukuju telitoknu partenogenezu kod mnogih *Trichogramma* vrsta, što rezultira u produkciji ženskog potomstva, odnosno u pomeranju odnosa polova u populacijama *Trichogramma* u korist ženki, a što s aspekta biološke borbe predstavlja prednost, jer su ženke upravo te koje parazitiraju jaja štetnih insekata, utvrđivanje prisustva endosimbiontske bakterije roda *Wolbachia* u populacijama osica *Trichogramma* na teritoriji Vojvodine je takođe bio jedan od ciljeva ovog rada.

Imajući u vidu ranija iskustva monitoringa kukuruznog plamenca na području Vojvodine, koja su pokazala aktivnost parazitoidnih osica roda *Trichogramma* u parazitiranju jajnih legala ove štetočine, u periodu sprovođenja ovog istraživanja takođe se očekivao pozitivan nalaz parazitiranih jajnih legla kukuruznog plamenca osicama ovog roda. Iskustva brojnih autora ukazala su na objektivne teškoće i ograničenost morfološke identifikacije parazitoidnih osica roda *Trichogramma* do nivoa vrsta, naročito kada se radi o jedinkama ženskog pola. Stoga se očekivalo da će primena pouzdanih molekularnih metoda identifikacije dati rezultate u određivanju prisutnih vrsta, kao i eventualno postojanje interspecijske i intraspecijske genetičke varijabilnosti u autohtonim populacijama osica *Trichogramma* spp. na području Vojvodine. Nadalje, takođe se očekivalo da će primena molekularnih metoda pokazati eventualno prisustvo endosimbionatskih bakterija roda *Wolbachia* u populacijama osica *Trichogramma* spp. na području Vojvodine. U širem kontekstu, očekivalo se da će rezultati ovog istraživanja doprineti spoznaji diverziteta korisne entomofaune na teritoriji Vojvodine, odnosno Srbije, boljem razumevanju njenog značaja i

neophodnosti očuvanja, te da će predstavljati osnovu za dalja istraživanja mogućnosti šireg korišćenja prirodnih populacija korisnih vrsta roda *Trichogramma* u suzbijanju ekonomski značajnih poljoprivrednih štetočina ekološki prihvatljivim metodama, kao što je biološka borba.

3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. Sezonski monitoring *Ostrinia nubilalis*

Tokom 2016. i 2017. godine dinamika leta adulta kukuruznog plamenca praćena je svetlosnim klopama, postavljenim na dva lokaliteta na teritoriji opštine Kikinda (Kikinda i Banatska Topola). Svetlosne klopke RO tipa (SZTR "Žica") postavljene na dva metra visine i aktivirane su uvećernjim satima (u sumrak), a gašene u vreme svitanja (Slika 15). Očitavanje brojnosti adulta plamenca je vršena svakodnevno u period od početka aprila do kraja septembra. Praćenje dinamike populacije kukuruznog plamenca bilo je važno kako bi se utvrdio broj generacija štetoćine u toku sezone, a naročito radi utvrđivanja perioda najintenzivnije aktivnosti leta, u toku kojih se dešava i najintenzivnija ovipozicija. Utvrđivanje perioda najintenzivnije ovipozicije ženki plamenca omogućilo je i određivanje perioda tokom kojih će sa najvećom verovatnoćom biti registrovana parazitirana jajna legla. Sezonski monitoring plamenca je ujedno sproveden u sklopu aktivnosti autora za potrebe Prognozno-izveštajne službe zaštite bilja Srbije.

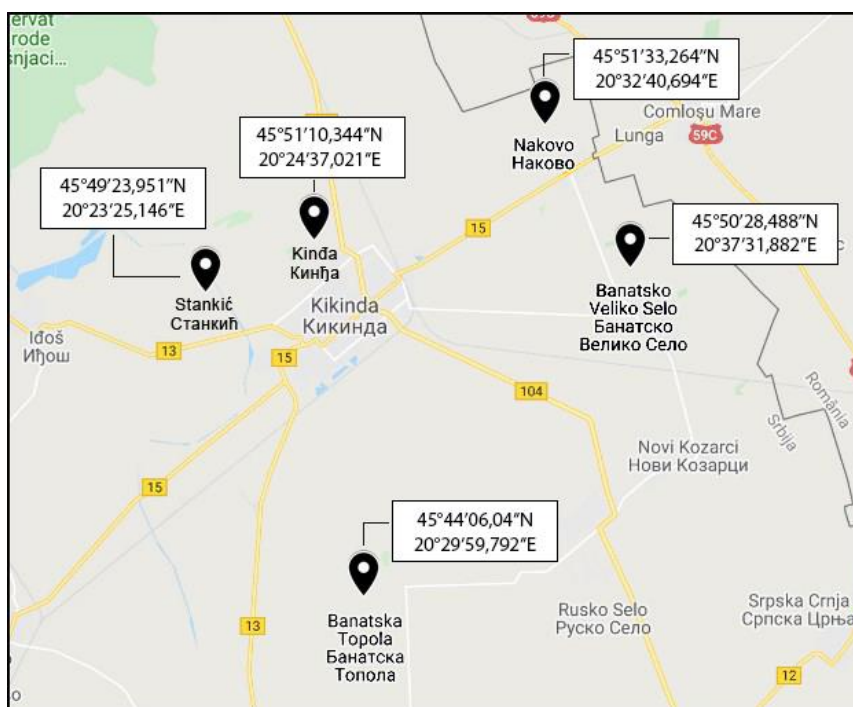


Slika 15. Svetlosna klopka korišćena za praćenje dinamike leta plamenca na teritoriji opštine Kikinda u 2016. i 2017. godini (Foto: Ivezić, 2016)

3.2. Uzorkovanje i skladištenje *Trichogramma osica*

Prilikom vizuelnih pregleda useva kukuruza i uzorkovanja parazitiranih jajnih legala plamenca, određivanje geografskog položaja (koordinata) praćenih lokaliteta izvršeno je uz pomoć GPS uređaja Trimble Juno SC.

U toku 2016.godine, uzorkovanje parazitiranih jajnih legala plamenca u usevu kukuruza izvršeno je na 5 različitih lokaliteta na teritoriji opštine Kikinda: Kinđa, Stankić, Banatska Topola, Nakovo i Banatsko Veliko Selo (Slika 16). Uzorkovanje parazitiranih jajnih legala izvršeno je u trećoj dekadi jula, prvoj i drugoj dekadi avgusta meseca 2016.godine, tokom aktivnosti II generacije ove štetočine.

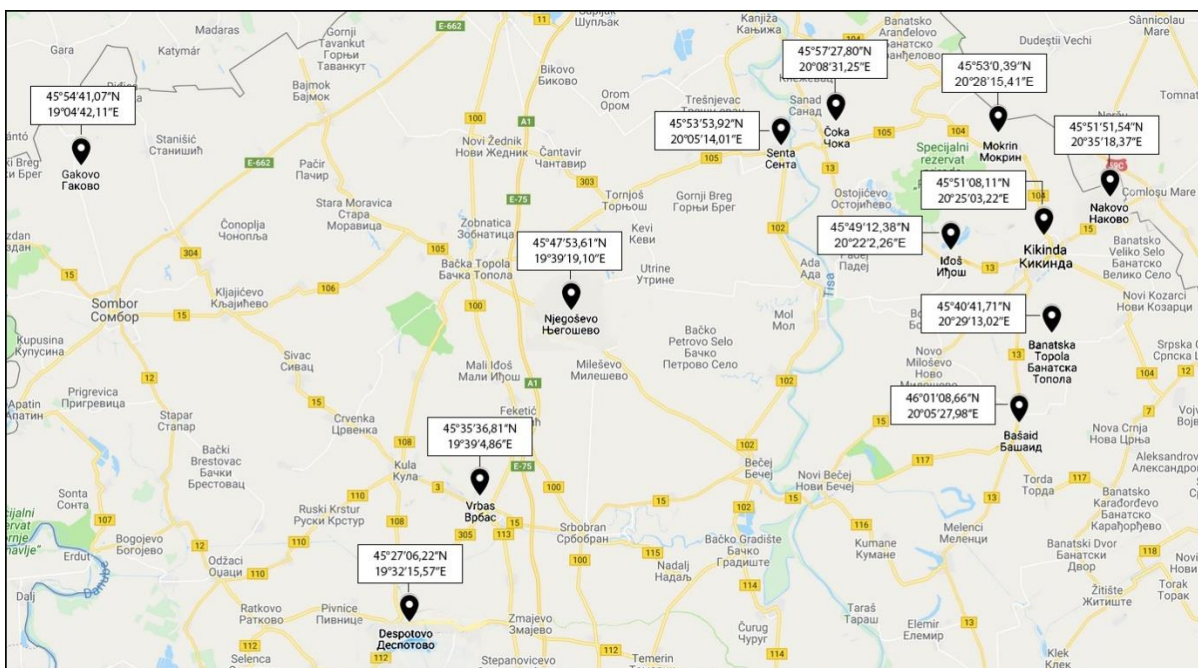


Slika 16. Lokalizetati na kojima je izvršeno uzorkovanje parazitiranih jajnih legala kukuruznog plamenca u 2016. godini (izvor: Google maps, podatke o geografskom položaju (koordinate) prikupio i uneo autor).

U toku 2017.godine, uzorkovanje parazitiranih jajnih legala plamenca u usevu kukuruza izvršeno je na 12 različitih lokaliteta na teritoriji Vojvodine: Kikinda, Mokrin, Idjoš, Bašaid, Nakovo, Banatska Topola, Njegoševo, Despotovo, Čoka, Senta, Vrbas i Gakovo (Slika 17). Uzorkovanje parazitiranih jajnih legala izvršeno je u periodu od jula do oktobra 2017. godine, tokom aktivnosti II i III generacije kukuruznog plamenca.

Prilikom uzorkovanja parazitiranih jajnih legala tokom 2016.i 2017. godine pregledan je po jedan usev merkantilnog kukuruza na svakom navedenom lokalitetu. U svakom usevu kukuruza, koji je uzgajan po principima konvencionalne proizvodnje, pregledano je po 100

biljaka kukuruza po metodi Reid i saradnika (1996). Parazitirana jajna legala, koja se razlikuju od neparazitiranih legala po tamnoj boji jaja, sakupljena su sa lista kukuruza. Sva sakupljena parazitirana jajna legala su bila izdvojena u zasebnim, adekvatno obeleženim falkonima i držana na sobnoj temperaturi od 25°C nekoliko dana do pojave adulta parazitoida. Eklodirane jedinke parazitoida iz svakog uzorkovanog jajnog legla su pojedinačno konzervirane u 95% etanolu (proizvođač Reahem) i čuvane u frižideru na temperaturi od 4 °C do identifikacije. Konzervirane jedinke podvrgnute su morfološkoj i molekularnoj identifikaciji, pri čemu je morfološkim putem izvršena identifikacija parazitoida do nivoa roda, dok je molekularnim putem izvršena identifikacija do nivoa vrste.



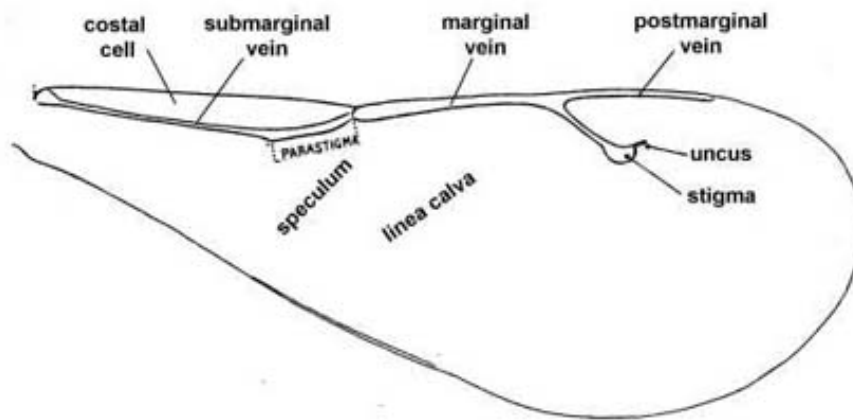
Slika 17. Lokaliteti na kojima je izvršeno uzorkovanje parazitiranih jajnih legala kukuruznog plamena u 2017. godini (izvor: Google maps, podatke o geografskom položaju (koordinate) prikupio i uneo autor).

3.3. Morfološka identifikacija *Trichogramma* parazitoida

Morfološka identifikacija uzorkovanih jedinki izvršena je na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, na Departmanu za fitomedicinu i zaštitu životne sredine. Korišćeni su ključevi za identifikaciju koje je opisao Pinto (1997). Prilikom observacije morfoloških karaktera korišćena je binokularna lupa Wild Photomicroscope M400.

Krilati predstavnici nadfamilije Chalcidoidea, u koje spadaju vrste iz familije Trichogrammatidae i roda *Trichogramma*, imaju dva para membranoznih krila, sa prednjim krilima koja su značajno veća od zadnjih. Specifično za predstavnike nadfamilije

Chalcidoidea, što ih razlikuje od ostalih predstavnika reda Hymenoptera, je izrazito redukovana nervatura prednjih krila. (Slika 18) (Gibson i sar., 1997).



Slika 18. Morfologija prednjeg krila Chalcidoidea (Preuzeto sa: <https://www.nhm.ac.uk/our-science/data/chalcidoids/morphology.html>)

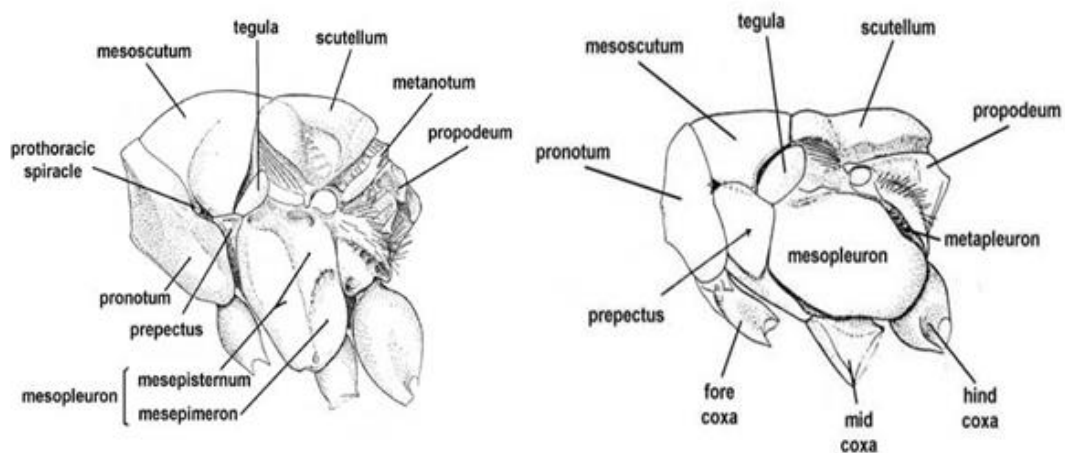
Nervatura prednjih krila se najčešće grana apikalno i sastoji se submarginalnog, marginalnog, postmarginalnog i stigmalnog nerva. Na žalost nervatura krila nije uvek pouzdan morfološki karakter, jer i neke druge parazitske mikrohimenoptere, poput predstavnika familije Scelionidae (nadfamilija Platygastroidea), imaju vrlo sličnu nervaturu prednjih krila, pa se vrlo često dešava da se i ova familija pogrešno svrstava u nadfamiliju Chalcidoidea (Gibson i sar., 1997).

Pojedini predstavnici nadfamilije Chalcidoidea se veoma uspešno determinišu na osnovu izraženog metalnog sjaja. Međutim, postoje brojni predstavnici ove nadfamilije, pogotovo apterni i brahipterni predstavnici koji nemaju izražen metalni sjaj, pa se u tom slučaju posmatraju druge morfološke karakteristike kako bi se omogućilo njihovo razlikovanje od drugih Hymenoptera (Gibson i sar., 1997).

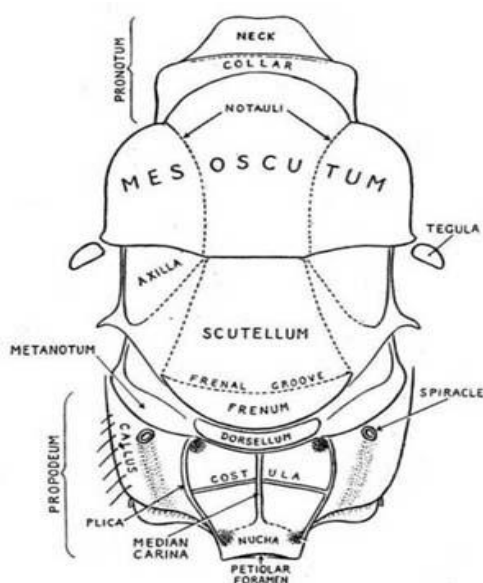
Pored navednih morfoloških karakteristika, identifikacija nadfamilije Chalcidoidea se često vrši na osnovu karakteristika toraksa. Kod većine predstavnika Chalcidoidea pronotum je jasno razdvojen od osnove prednjih krila zbog postojanja intersegmentalnog sklerita – prepektusa, koji se nalazi između pronotuma i mezopleurona (Slika 18).

Bitna morfološka karakteristika, koja predstavnike nadfamilije Chalcidoidea razlikuje od drugih Hymenoptera, je specifičnost u položaju mezotorakalne stigme. Iako je teško uočljiva, mezotorakalna stigma kod Chalcidoidea zauzima jedinstven položaj i locirana je između pronotuma i bočne ivice mezoskutuma. Vrlo često je smeštena iznad dorzalne strane prepektusa i razdvojena je od dorzalne ivice mezopleurona. Kod ostalih Hymenoptera

mezotorakalna stigma zauzima drugačiji položaj i locirana je ili između zadnje ivice pronotuma i prednje ivice mezopleurona ili na samom pronotumu. Takođe, ostale osice sa redukovanom nervaturom krila, tj. nervaturom krila koja je slična sa nervaturom Chalcidoidea, imaju pronotum koji se dodiruje sa tegulom, skleritom koji pokriva osnovu prednjih krila, što nije slučaj kod predstavnika Chalcidoidea kod kojih su tegule vidno udaljene od pronotuma (Slika 19, 20). Kao posledica ovakve razlike u morfološkoj građi, većina predstavnika nadfamilije Chalcidoidea ima pokretan pronotum u odnosu na mezotoraks, za razliku od drugih Hymenoptera kod kojih je pronotum čvrsto vezan sa mezotoraksom (<http://www.canacoll.org/Hym/Staff/Gibson/chalcid.htm>).

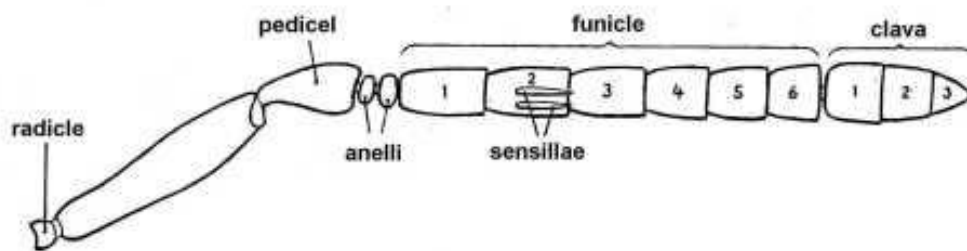


Slika 19. Građa toraksa kod predstavnika nadfamilije Chalcidoidea- bočna strana (<https://www.nhm.ac.uk/our-science/data/chalcidoids/morphology.html>).



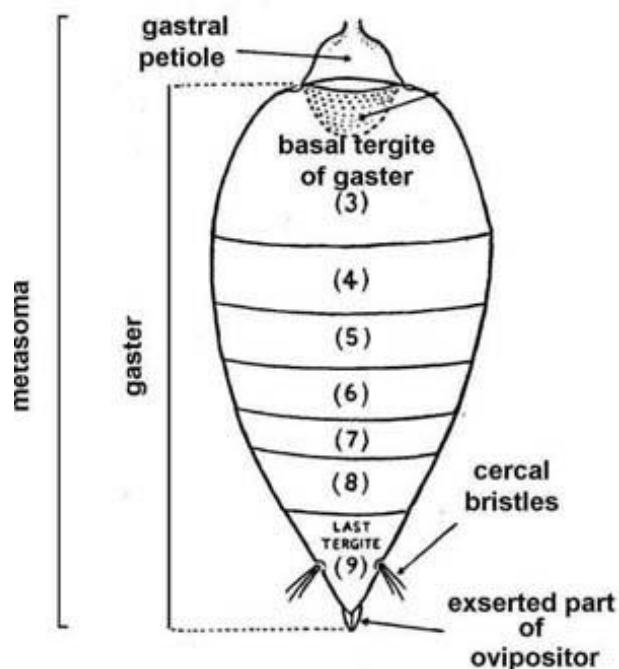
Slika 20. Građa toraksa kod predstavnika nadfamilije Chalcidoidea - dorzalna strana (<https://www.nhm.ac.uk/our-science/data/chalcidoids/morphology.html>).

Za determinaciju predstavnika ove nadfamilije vrlo često se posmatra i građa antena. Kod Chalcidoidea flagelum se sastoji od segmentiranog funikulusa (suženi deo flageluma) i klavusa (glavičastog dela flageluma). Broj segmenata funikulusa se kreće od 1 do 10 (Slika 21), dok se broj segmenata klavusa kreće od 2 do 6 koji su delimično ili u potpunosti fuzionisani (Gibson i sar., 1997).



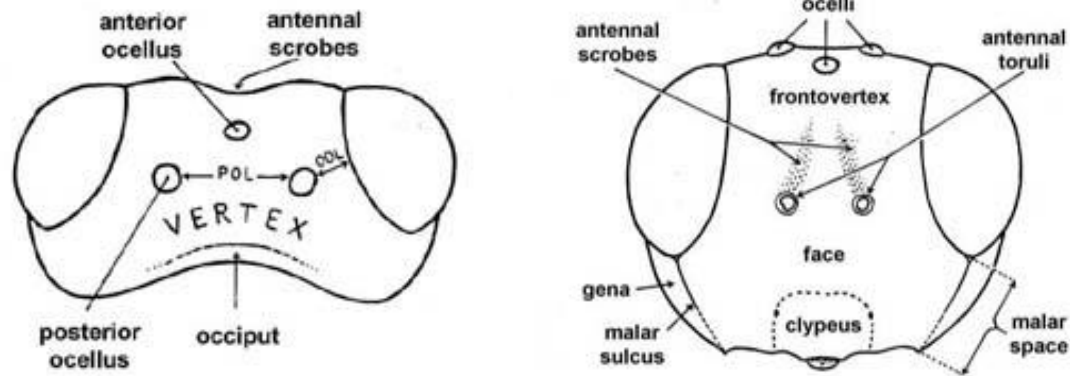
Slika 21. Građa antene kod predstavnika nadfamilije Chalcidoidea (Preuzeto sa: <https://www.nhm.ac.uk/our-science/data/chalcidoids/morphology.html>)

Abdomen Chalcidoidea se sastoji od propodeuma (prvi abdominalni segment), petiolusa (drugi abdominalni segment) i 7 ili 8 segmenata koji čine gaster. Na osmom abdominalnom segmentu se nalazi par stigmi, dok se na poslednjem abdominalnom segmentu vrlo često nalaze vidljivi cerci (Slika 22) (Gibson i sar., 1997).



Slika 22. Građa abdomena kod predstavnika nadfamilije Chalcidoidea (Preuzeto sa: <https://www.nhm.ac.uk/our-science/data/chalcidoids/morphology.html>)

Položaj glave i usnog otvora u odnosu na telo kod Chalcidoidea je najčešće opistognatan i kod pojedinih predstavnika hipognatan. Skoro svi predstavnici ove nadfamilije imaju par facetovanih očiju, koje se sastoje od velikog broja faceta i tri ocele koje obrazuju trougao između facetovanih očiju (Slika 23) (Gibson i sar., 1997).



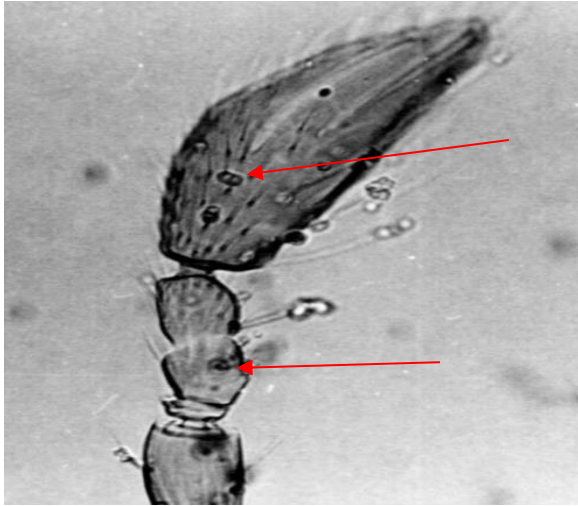
Slika 23. Građa glave kod predstavnika nadfamilije Chalcidoidea (Preuzeto sa: <https://www.nhm.ac.uk/our-science/data/chalcidoids/morphology.html>).

Familiju Trichogrammatidae odlikuju sledeće karakteristike (<https://www.nhm.ac.uk/our-science/data/chalcidoids/trichogrammatidae.html>):

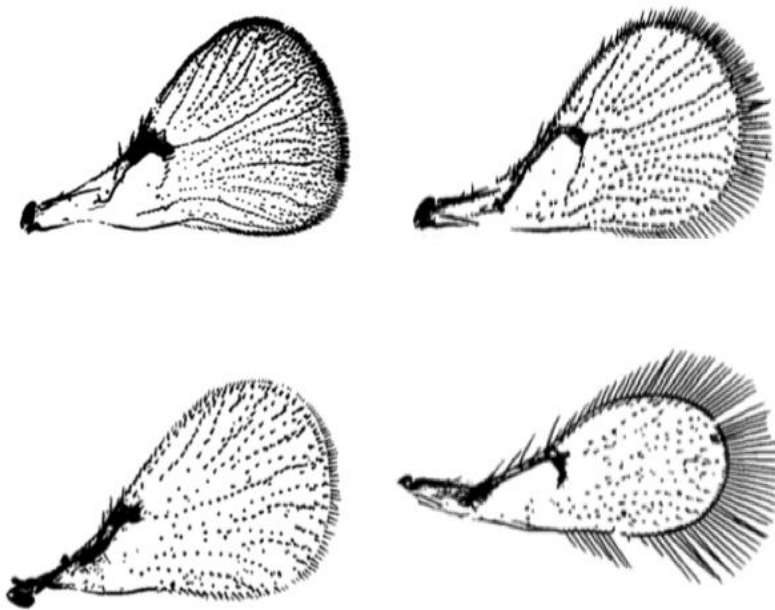
- Izrazito sitne dimenzije od 0,3 do 1,8 mm (uključujući ovipozitor)
- Tročlani tarzusi
- Nemaju metalni sjaj
- Dvočlani funikulus (Slika 24)

Još jedna karakteristika koja razlikuje Trichogrammatidae od drugih Chalcidoidea su uzdužne, naborane sensile (čulna telašca) na jednoj ili više flagelomera, pri čemu se vrhovi sensila nalaze na površini flegelomere (Slika 24). Slika 24 pokazuje dvočlani funikulus, što je karakteristično za predstavnike ove familije. Broj segmenata funikulusa je važna determinacijska karakteristika familije Trichogrammatidae, jer kod ostalih familija nadfamilije Chalcidoidea, funikulus može sadržati od 1 do 10 segmenata (Doutt i Viggiani, 1968).

Trichogrammatidae, kao i ostale Chalcidoidea imaju redukovanu nervaturu krila. Kod Trichogrammatidae postmarginalni nerv je retko uočljiv ili je izrazito redukovano. Ono što ih razlikuje od drugih predstavnika nadfamilije su sete na krilima (Slika 25), koje su često raspoređene u 4 ili više uzdužnih ili radijalnih linija (Doutt i Viggiani, 1968).



Slika 24. Flagelum kod predstavnika familije *Trichogrammatidae*, strelice označavaju senzile (foto: Krnjajić, 2002)



Slika 25. Sete na prednjim krilima kod pojedinih rodova familije *Trichogrammatidae* (Izvor: Pinto, 1997).

Prema Pinto (1997) određene morfološke karakteristike specifične za *Trichogrammatidae* značajno olakšavaju razlikovanje predstavnika ove familije od drugih *Chalcidoidea*:

- kompaktan oblik tela bez izraženog suženja između mesosome i metasome
- svetložuta do tamno braon boja tela, vrlo često kombinacija obe boje

- glatka kutikula
- kratak pronotum
- oblik krila varira od izrazito uskih do izrazito širokih
- retki su beskrilni i brahipterni predstavnici
- izražen polni dimorfizam

Pinto (1997) daje dihotomi ključ za morfološku determinaciju pojedinih rodova iz familije Trichogrammatidae, a u nastavku teksta je dat prevod dela ključa sa engleskog jezika koji obuhvata identifikaciju roda *Trichogrammai* i pojedinih sličnih rodova:

1.

Beskrilne ili brahipterne forme, kada su prednja krila skupljena ne dodiruju vršni deo (apex) metasome.....44
 Krilate forma, kada su prednja krila skupljena približavaju se i prelaze bočnu ivicu metasome.....2

2.

Flagelum bez funikulusa, sastoji se samo od anelusa i klave.....3
 Flagelum sadrži jedan ili dva funikulusa između anelusa i klave (Slike 24 i 26).....16

16.

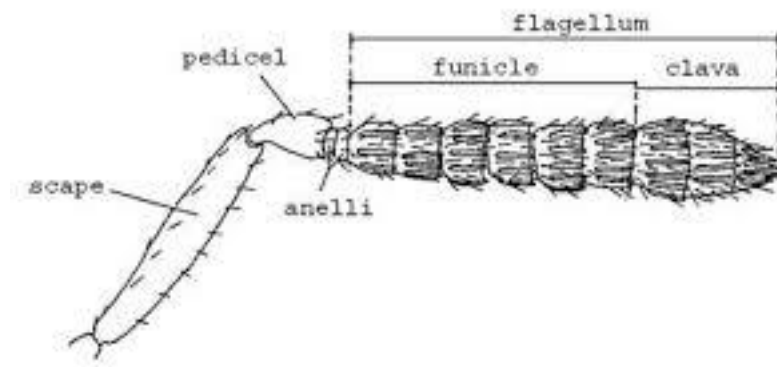
Uska prednja krila, sužena na vrhu; sužavanje izraženo od zone nerava krila prema vrhu krila; flagelum se sastoji od jasno izraženog dvosegmentiranog funikulusa.....*Hydrophilita*
 Ghesquiere

Prednja krila promenljivog oblika, ali se ne sužavaju od zone nerava krila prema vrhu, pri vrhu krila delimično šira nego u predelu nervature; flagelum sadrži jedan ili dva funikulusa.....17

17.

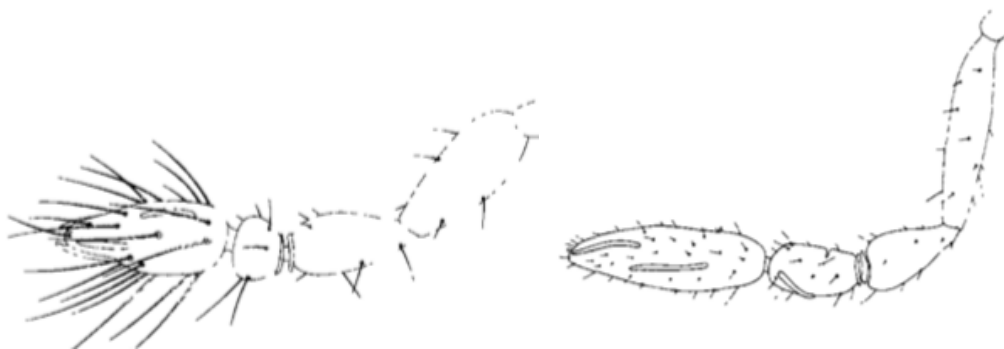
Funikulus se sastoji od jednog ili dva segmenta; prednja krila uska, od 2,5 do 8 puta duža nego šira, sete ne formiraju setalne linije, vrlo često razvijeno svega nekoliko seta, marginalna seta izražena i doseže bar trećinu širine krila u najširem delu; mezoskutum i skutelum uglavnom sa jednim parom seta.....18

Funikulus se sastoji od jednog ili dva segmenta; prednja krila promenjivog oblika, ukoliko se funikulus sastoji od jednog segmenta prednja krila su široka, dok je dužina krila kraća od 2,5 širine krila u najširem delu; marginalna seta kraća od jedne trećine krila u najširem delu. Mezoskutum i skutelum sa dva para seta 24



Slika 26. Gradja antene kod Trichogrammatidae (Izvor: Pinto, 1997)

24.
 Nesegmentirana klava (Slika 27).....25
 Klava se sastoji od dva do četiri segmenta31



Slika 27. Antena kod Trichogrammatidae sa nesegmentiranom klavom (Izvor: Pinto, 1997)

25.
 Stigmalni nerv redukovan, sastoji se od kratkih nastavaka na vrhu marginalnog nerva.....*Paratrichogramma* Girault
 Stigmalni nerv izražen, širok i dugačak.....26

26.

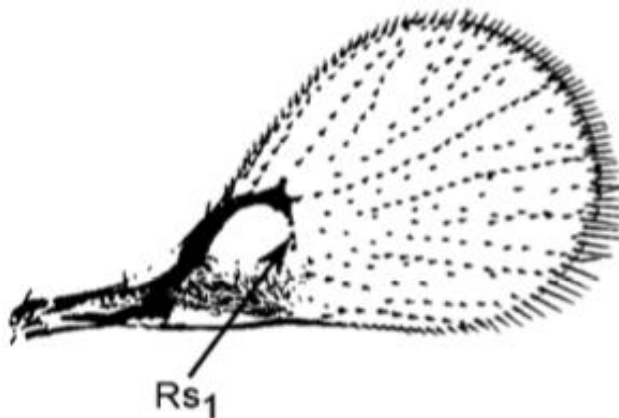
Ženke: nervatura prednjeg krila u obliku slova sigma (Σ), marginalni nerv zakrivljen na vrhu i nastavlja se u dugačak stigmalan nerv, dva nerva nisu jasno razdvojena27

Oba pola: nervatura prednjeg krila ne obrazuje slovo sigma (Σ), marginalni nerv se pri vrhu naglo završava i vrlo jasno se razlikuje od stigmalnog nerva28

27.

Prednja krila sa Rs_1 nervom, setalne linije predstavljene sa najmanje nekoliko seta (Slika 28 i 29).....*Trichogramma*

Prednja krila bez Rs_1 nerva*Trichogrammatoidea* Girault



Slika 28. Nervatura krila kod predstavnika roda *Trichogramma* (Izvor: Pinto, 1997)



Slika 29. Mikroskopski snimak prednjeg krila *T. brassicae* (foto: Ivezić)

U nastavku je dat prikaz disekovane antene (Slika 30), genitalne armature mužjaka (Slika 31) i izgled ženke po izletanju iz parazitiranog jajeta kukuruznog plamenca (Slika 32).



Slika 30. Mikroskopski snimak antene mužjaka *T. brassicae* (foto: Ivezić)



Slika 31. Mikroskopski snimak gradje genitalija kod mužjaka *T. brassicae* (foto: Ivezić)



Slika 32. Mikroskopski snimak ženke *T. brassicae* (foto: Ivezić)

3.4. Molekularna identifikacija uzoraka

Imajući u vidu da je identifikacija vrsta roda *Trichogramma* na bazi morfoloških karakterata izuzetno komplikovana i nepouzdana, naročito kada su u pitanju ženke, odgajeni primerci osica su podvrgnuti molekularnoj identifikaciji.

3.4.1. Molekularna identifikacija uzoraka prikupljenih u 2016. godini

Trichogramma jedinke su uzorkovane 2016.godine na teritoriji opštine Kikinda i podvrgnute molekularnoj identifikaciji na Departmanu za entomologiju u Riverside-u (Univerzitet Kalifornija, SAD) pod nadzorom prof. dr Richard Stauthamer-a i dr Paul Rugman Jones-a. Pored toga, molekularnim metodama je izvršeno utvrđivanje prisustva endosimbiontske bakterije *Wolbachia* sp. u uzorcima osica, kao i utvrđivanje intraspecijskog diverziteta *Trichogramma*.

3.4.1.1. Molekularna identifikacija vrsta roda *Trichogramma*

Molekularna identifikacija jedinki roda *Trichogramma* je izvršena analizom redosleda nukleotida na ITS2 regionu ribozomalne DNK, i odvijala se u sledećim fazama:

- DNK ekstrakcija

- Amplifikacija ITS2 regiona rDNK (PCR)
- Elektroforeza amplikona
- Prečišćavanje amplikona
- Sekvenciranje amplikona
- Poravnavanje očitanih sekvenci korišćenjem BLAST programa
- Upoređivanje očitanih sekvenci sa sekvencama u GenBanci (onlajn)
- Obrada i tumačenje rezultata molekularnih analiza

DNK ekstrakcija:

DNK ekstrakcija je predstavljala prvi korak u molekularnoj identifikaciji uzoraka prikupljenih u 2016.godini. Za DNK ekstrakciju primenjene su dve metode:

- Ekstrakcija sa Chelex smolom i proteazom K
- Neinvazivna HotShot ekstrakcija

Ekstrakcija sa Chelex smolom i proteazomK:

Za izolaciju DNK materijala primenjeni su sledeći reagensi:

- Proteaza-K (New England Biolabs - NEB, Ipswich, MA, USA)
- Chelex suspenzija (5%) (NEB)

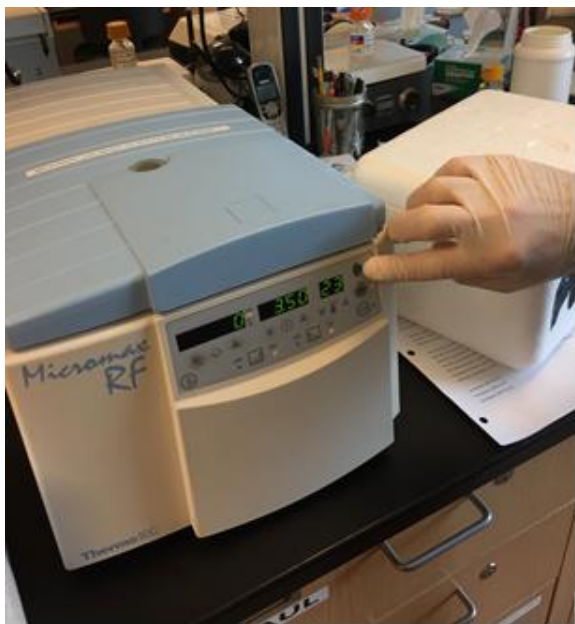
Procedura je sprovedena korišćenjem sledeće opreme:

- Falkoni (Eppendorf)
- Pipete (0,2-1000 μ l) (Eppendorf)
- Četkica (YouDent)
- Stakleni štapić (Shutterstock)
- Vodeno kupatilo (Eppendorf)
- Centrifuga (Micromax RF, Thermo IEC)
- Vortex šejker (Ika)

Protokol za DNK ekstrakciju Chelex smolom

Po jedna eklođirana ženka iz svakog uzorkovanog parazitiranog jajnog legla kukuruznog plamenca je podvrgnuta DNK ekstrakciji primenom Chelex metode. Za ekstrakciju DNK materijala korišćene su isključivo ženke, jer su ženke diploidne i raspoložu sa više DNK materijala u odnosu na haploidne mužjake. Za ovu metodu koristila se 5%

Chelex suspenzija. U poklopac falkona postavljeno je 2 μ l proteaze-K i po jedna *Trichogramma* jedinka za svaki ispitivani uzorak, odnosno jajno leglo. *Trichogramma* jedinke konzervirane u etanolu su nakon vađenja iz falkona prosušene na filter papiru i uz pomoć četkice prenešene u poklopac falkona kako bi došle u kontakt sa proteazom-K. Falkoni sa proteazom-K i osicama su poklopljeni i postavljeni su u centrifugu na 14.000 rpm (Slika 33) u trajanju od 15 do 20 sekundi kako bi se osice sa proteazom-K pozicionirale na dnu falkona. Uz pomoć sterilnog staklenog štapića izvršeno je maceriranje *Trichogramma* osica, a za svaki uzorak upotrebljen je poseban sterilisani štapić radi sprečavanja mešanja DNK materijala iz različitih uzoraka. U svaki falkon sa maceriranim uzorcima dodato je po 60 μ l Chelex suspenzije. Falkoni sa maceriranim uzorcima i Chelex suspenzijom postavljeni su na zagrevanje u vodeno kupatilo u trajanju od 60 minuta na 55°C, a zatim na 99°C u trajanju od 10 minuta. Nakon zagrevanja u vodenom kupatilu, falkoni su centrifugirani u trajanju od 4 minuta, pri čemu se Chelex smola istaložila na dnu falkona, neposredno ispod ekstrahovane DNK. Uz pomoć pipete, izolovanu DNK smo pažljivo preneli u nove i obeležene falkone, dok je talog Chelex smole ostao na dnu falkona u kojima se vršila ekstrakcija. Ekstrahovana DNK iz svake pojedinačne *Trichogramma* jedinke uskladištena je u zamrzivaču na -20°C u posebnom i jasno obeleženom sterilnom falkonu.



Slika 33. Centrifugiranje testiranih *Trichogramma* jedinki sa proteazom-K (Foto: Ivezić, 2017).

Ekstrakcija HotSHOT metodom:

Neinvazivna DNK ekstrakcija (HotSHOT metoda) izvršena je po proceduri koju su opisali Truett i saradnici (2000), korišćenjem sledećih reagenasa i opreme:

Reagensi:

- 100 mM NaOH (rastvor 1A) (NEB)
- 50 mM Na₂EDTA (rastvor 1B) (NEB)
- 40 mM Tris-HCl (rastvor 2) (NEB)

Oprema:

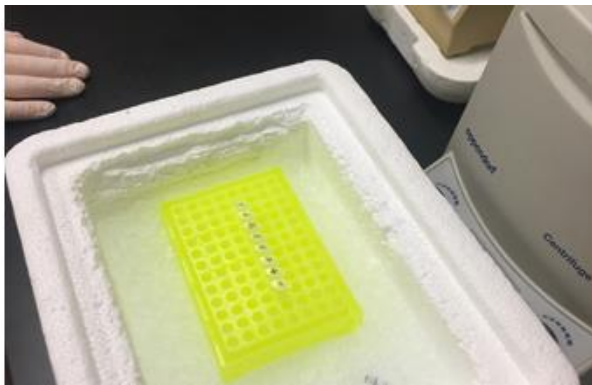
- Pipete
- Falkoni
- Vodeno kupatilo
- Vortex
- Mikroskop (Axio Lab.A1)

Postupak DNK ekstrakcije HotShot metodom je neinvazivna i brza metoda, koja se vrlo često primenjuje kako bi se procedura DNK ekstrakcije pojednostavila i ubrzala. Takođe, HotShot procedura obezbeđuje nepromenjene morfološke karakteristike ispitivanih jedinki, što omogućava da se rezultati molekularne identifikacije potvrde i morfološkim putem. DNK ekstrakcija počinje mešanjem rastvora 1A i 1B u odnosu 1:3, te se za dobijanje smeše od 24 µl, neophodne za izolaciju DNK materijala iz pojedinačne *Trichogramma* jedinke, koristilo 6 µl rastvora 1A i 18 µl rastvora 1B. Za ekstrakciju DNK iz svake pojedinačne jedinke pripremljeni su i obeleženi zasebni sterilni falkoni sa 24 µl smeše rastvora 1A i 1B. Za DNK ekstrakciju HotShot metodom takođe su upotrebljene ženke zbog većeg sadržaja DNK materijala. Jedinke koje su bile konzervirane u 95% etanolu, su prosušene na filter papiru, a zatim uz pomoć četkice postavljene u smešu za DNK ekstrakciju (pH=12). Vrlo je bitno da jedinke dođu kontakt sa pripremljenom smešom, stoga se falkoni sa osicama i smešom za ekstrakciju postavljaju u vortex na nekoliko sekundi (Slika 34). Uz pomoć mikroskopa je neophodno potvrditi da se uzorci nalaze u pripremljenom rastvoru, a ne na zidu falkona. Kada se potvrdio kontakt ispitivanih jedinki sa smešom za ekstrakciju, falkoni su postavljeni na zagrevanje u vodeno kupatilo na 95°C u trajanju od 30 minuta, a zatim su ohlađeni na ledu u trajanju od 1 minuta (Slika 35). Nakon hlađenja, svakom pojedinačnom uzorku dodat je rastvor 2 u dozi od 24 µl. Rastvor 2 je rastvor za neutralizaciju koji pH vrednost dobijene smeše smanjuje sa 12 na 7. Navedena procedura ne utiče na morfološke karakteristike testiranih *Trichogramma* jedinki, pa se takve jedinke konzerviraju i po potrebi podvrgavaju

analizi morfoloških karakteristika. Izolovanu DNK smo uskladištili u zamrzivaču na -20°C , dok su jedinke podvrgnute DNK ekstrakciji konzervirane u 95% etanolu u posebnim i obeleženim falkonima i uskladištili u frižideru na 4°C .



Slika 34. Vorteks za homogenizaciju reagenasa (Foto: Ivezić, 2017).



Slika 35. Hlađenje uzoraka prethodno zagejanih u vodenom kupatilu (Foto: Ivezić, 2017).

Iz svakog uzorkovanog parazitiranog jajnog legla izdvojene su po dve *Trichogramma* ženke, od kojih je jedna podvrgnuta DNK ekstrakciji uz pomoć Chelex metode, dok je druga jedinka iz istog parazitiranog jajnog legla plamenca podvrgnuta ekstrakciji uz pomoć HotShot metode. Kako je amplifikacija ITS2 regiona sprovedena korišćenjem ekstrakcije dobijene HotShot metodom dala pozitivne rezultate, odnosno zadovoljavajuću količinu izolovanog DNK materijala, postupak molekularne identifikacije uzorkovanih parazitoida nastavljen je korišćenjem DNK materijala dobijenog neinvazivnom HotShot metodom. Pošto je metoda

DNK ekstrakcije sa Chelex smolom vremenski zahtevnija od HotShot metode, u daljem istraživanju ekstrakcija DNK materijala iz uzorkovanih jedinki je vršena isključivo uz pomoć HotShot neinvazivne metode. Izolovan DNK materijal iz svake pojedinačne jedinke je obeležen i upotrebljen je u daljem postupku amplifikacije ITS2 regiona rDNK radi analize redosleda nukleotida na pomenutom DNK segmentu.

Amplifikacija ITS2 regiona korišćenjem standardnih prajmera za *Trichogramma* spp.

Korišćenjem izolovanog DNK materijala, pristupilo se amplifikaciji ITS2 regiona rDNK. Za svaki ispitivani uzorak pripremljeno je 23 µl PCR mastermiksa od sledećih reagenasa:

- 13,3 µl dd H₂O
- 2,5 µl Thermopol PCR pufera (NEB)
- 1 µl MgCl₂(NEB)
- 0,5 µl prajmer ITS2– forward (ThermoFisher Scientific)
- 0,5 µl prajmer ITS2 – reverse (ThermoFisher Scientific)
- 0,2 µl Taq polimeraza (5 units/µl) (NEB)
- 5 µl dUTPs (NEB)

Za amplifikaciju upotrebljena je sledeća oprema:

- Amplifikator (Eppendorf North America Inc., New York, NY, USA)
- PCR falkoni (Eppendorf)
- Pipete
- Vortex

Za amplifikaciju ITS2 regiona koristili su se sledeći prajmeri: prajmer „napred“ (forward), 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3' lociran na 5.8S genu rDNK i prajmer „nazad“ (reverse) 5'-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3' lociran na 28S genu rDNK. Za pripremanje 25 µl PCR reakcione smeše upotrebljeno je 2 µl izolovane DNK po uzorku i 23 µl pripremljenog PCR mastermiksa. Mastermiks je neposredno pre mešanja sa DNK materijalom postavljen u vortex radi homogenizacije upotrebljenih reagenasa. Amplifikacija uzoraka sprovedena je sa dva kontrolna uzorka (pozitivna i negativna kontrola). Negativna kontrola sadržala je 23 µl PCR mastermiksa, dok je pozitivna kontrola pripremljena od 23 µl mastermiksa i 2 µl DNK poznatog uzorka. Tokom ove procedure, kao pozitivna kontrola korišćen je DNK materijal izolovan iz *T. pretiosum*. Ukoliko amplifikacija negativnog kontrolnog uzorka ne rezultira PCR produktom, odbacuje se mogućnost kontaminacije

pripremljenog mastermiksa. Pošto se amplifikacija pozitivnog kontrolnog uzorka sprovodi sa već identifikovanom *Trichogramma* vrstom, kao rezultat PCR reakcije očekuje se amplikon karakterističan za *Trichogramma* vrstu koja je upotrebljena kao pozitivan kontrolni uzorak, odnosno u ovom slučaju *T. pretiosum*. U slučaju da ni pozitivna kontrola ne rezultira PCR produktom, postupak DNK ekstrakcije i amplifikacije je neophodno ponoviti. Pripremljena PCR reakciona smeša odgovarajućih uzoraka postavljena je u amplifikator (Slika 36), koji je prethodno podešen za amplifikaciju ITS2 regiona. PCR reakcija teče kroz temperaturne cikluse tokom kojih dolazi do razdvajanja DNK lanca, vezivanja prajmera za ciljno mesto (28S i 5.8S region DNK) i amplifikacije željene sekvence nukleotida. Amplifikacija ITS2 regiona kod *Trichogramma* spp. se obavlja pri sledećim temperaturnim uslovima: započinje preliminarnom denaturacijom na 95°C u trajanju od 3 minuta, sledi 37 ciklusa pri čemu se svaki ciklus sastoji od denaturacije u trajanju od 45 sekundi na 92°C, otpuštanja (annealing) u trajanju od 45 sekundi na 53°C i ekstenzije (extension) u trajanju od 1 minuta i 15 sekundi na 72°C. Nakon poslednjeg ciklusa obavlja se finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 3 minuta.



Slika 36. PCR amplifikator korišćen za amplifikaciju ITS2 regiona ispitivanih uzoraka (Foto: Ivezić, 2017).

Dužina amplikona (PCR produkata) dobijenih PCR reakcijom određena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu (Slika 37), dok su rezultati elektroforeze vizualizovani transiluminatorom (Slika 38).



Slika 37. Komora za elektroforezu. i postavljanje PCR produkata u gel za elektroforezu (Foto: Ivezić, 2016).



Slika 38. Transiluminator (Foto: Ivezić, 2016).

Elektroforeza:

Priprema gela za elektroforezu

Za pripremu agaroznog gela upotrebljeni su sledeći reagensi i oprema:

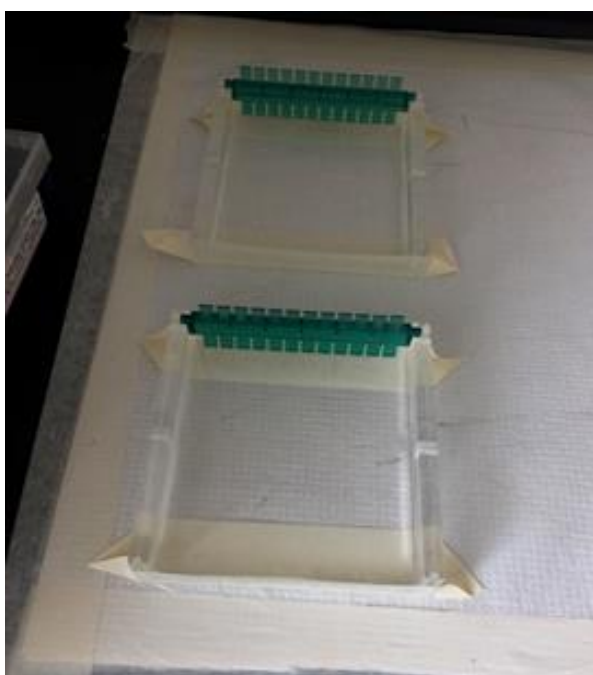
- Agaroza (myGenomics)
- TAE (Tris-acetate-EDTA) Pufer (ThermoFisher Scientific)
- Etidijum bromid (Advanced Synthesis)
- DNK ladder (Fermentas)

- Marker za bojenje amplikona (Fermentas)

Oprema:

- Komora za elektroforezu (Agilent Technologies)
- Češalj za elektroforezu (Agilent Technologies)
- Mikrotalasna rerna (Bosh)
- Pipete
- Erlenmajer boce(ThermoFisher Scientific)
- Transiluminator (Vilber lourmat TFP-M/WL)

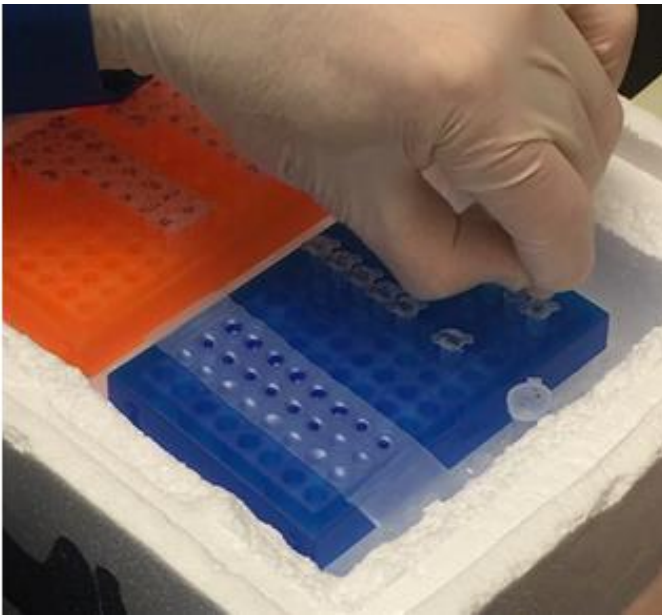
Za dobijanje 1% agaroznog gela upotrebljeno je 100 ml TAE pufera i 1 g agaroze. Dobijena smeša je zagrejana u mikrotalasnoj rerni u trajanju od 90 sekundi, nakon čega je rastopljenom agaru dodato 4 μ l etidijum bromida. Rastopljena agarozna prenešana je u posudu za elektroforezu sa prethodno postavljenim češljem (Slika 39). Nakon 20 minuta, iz ohlađenog i zgusnutog gela izvađen je češalj i posuda sa agaroznim gelom je postavljena u komoru za elektroforezu (Slika 37).



Slika 39. Polimerizacija agaroznog gela u posudi za elektroforezu na sobnoj temperaturi (Foto: Ivezić. 2016).

Dobijeni PCR produkti neposredno pre unošenja u agarozni gel obojeni su markerom za bojenje u odnosu 1:1. U našem istraživanju koristili smo 6 μ l PCR produkta i 6 μ l markera

za bojenje (Slika 40). Takođe, u agarozni gel je postavljeno i 7 μl supstance zvane DNK ladder (DNK lestvica), koja se satoji od smeše DNK fragmenata poznatih veličina, radi utvrđivanja dužine dobijenih amplikona. Nakon postavljanja PCR produkata u agarozni gel (Slika 37), komora za elektroforezu je povezana sa baterijom u trajanju od sat vremena pri odgovarajućem naponu struje (100V).



Slika 40. Mešanje PCR produkata sa markerom za bojenje (Foto: Ivezić. 2016).

Rezultati elektroforeze očitani su uz pomoć transiluminatora, u koji se postavio agarozni gel, prethodno izvađen iz komore za elektroforezu. Očekivana dužina ITS2 regiona kod *Trichogramma* vrsta kreće se u granicama od 400 do 700 baznih parova, stoga se nakon elektroforeze može doneti preliminarni zaključak da li ekstrahovana DNK pripada vrstama iz rod *Trichogramma*.

Za uzorke za koje nisu dobijeni amplikoni, ponovljen je postupak amplifikacije korišćenjem 5 μl DNK ekstrakcije i 20 μl PCR mastermiksa, a u slučaju da ni tada nisu dobijeni DNK produkti, uzorci su izostavljeni iz daljeg istraživanja, pod pretpostavkom da ispitivane *Trichogramma* jednike nisu sadržale dovoljno DNK materijala za amplifikaciju ITS2 segmenta rDNK.

Nakon izvršene amplifikacije i elektroforeze izvršeno je sekvenciranje uzoraka, radi određivanje sekvenci nukleotidnih baza (adenin, guanin, citozin, i timin) u dobijenim PCR produktima.

Prečišćavanje amplikona (purifikacija):

Procedura koja je prethodila sekvenciranju dobijenih amplikona je purifikacija. Purifikacija podrazumeva prečišćavanje dobijenih amplikona, odnosno razgradnju svih reagenasa koji ulaze u sastav mastermiksa (nukleotidi, prajmeri, polimeraza itd), a kao rezultat purifikacije dobija se čist PCR produkt.

Za purifikaciju upotrebljeni su sledeći reagensi:

- Ilustra Alkalna fosfataza (GE Healthcare)
- Ilustra Exonukleaza (GE Healthcare)
- ITS2 forward 1,6 mM
- ITS2 reverse 1,6 mM
- Dimetil-sulfoxid (NEB)

U ovom istraživanju, za purifikaciju PCR produkta korišćeni su enzimi za prečišćavanje, ilustrata ExoProStar komercijalni kitovi (GE Healthcare Life Sciences). Procedura prečišćavanja sprovedena je mešanjem 10 µl PCR produkta sa 1 µl alkalne fosfataze i 1 µl egzonukleaze. Procedura je izvedena zasebno za svaki testirani amplikon. Mešanje enzima sa PCR produktima obavlja se kako bi se razgradili svi preostali prajmeri i nukleotidi u PCR produktu. Nakon prečišćavanja amplikona obavila se denaturacija enzima zagrevanjem smeše enzima i PCR produkata. Dobijena smeša postavljena je u vodeno kupatilo na 37°C u trajanju od 30 minuta, a zatim na 80°C u trajanju od 15 minuta. Za sekvenciranje, prečišćenim amplikonima neophodno je dodati forward i reverse ITS2 prajmere specifične za *Trichogramma* vrste. Neposredno pre mešanja prajmera i amplikona, redukovana je molarna koncentracija prajmera sa 10 mM na 1,6 mM.

Smanjenje molarne koncentracije prajmera izvršeno je pripremanjem posebnog mastermiksa za svaki prajmer (forward i reverse) na sledeći način:

- 68 µl ddH₂O
- 37 µl Dimetil-sulfoxid
- 20 µl prajmera

Ovako razblaženi prajmeri dodati su prečišćenim amplikonima u odnosu 1:4 (1 µl prajmera +4 µl PCR produkta). Pošto se svaki razblaženi prajmer (forward i reverse) posebno meša sa prečišćenim amplikonom, za dobijeni broj amplikona pripremljen je dvostruko veći broj uzorka za sekvenciranje (tj. očitavanje redosleda i sastava nukleotida u sekvencama dobijenih amplifikacijom). Svi prečišćeni PCR produkti su poslani na sekvenciranje na

Institute for Integrative Genome Biology, Department of Biotechnology (University of California, Riverside).

Dobijene sekvence nukleotida na ITS2 regionu (forward i reverse) poravnate su korišćenjem programa BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.2.5.) i kao takve upoređene su sa BLAST programom sa poznatim sekvencama u onlajn Genbanci (GenBank NCBI-National Center for Biotechnology Information).

Multiplex PCR:

Multiplex PCR sproveden je korišćenjem specifičnih reverse prajmera, dizajniranih na Departmanu za entomologiju u Riverside-u na osnovu razlike u redosledu nukleotida na ITS2 segmentu rDNK kod *T. brassicae* i *T. evanescens*. Kao forward prajmer upotrebljen je univerzalan forward prajmer za amplifikaciju ITS2 regiona kod *Trichogramma* spp. dok su istovremeno upotrebljeni reverse prajmeri dizajnirani za *T. brassicae* i *T. evanescens*. Ovakvi prajmeri specifični su samo za ove dve *Trichogramma* vrste. U slučaju da se u PCR reakcionoj smeši nalazi DNK materijal izolovan iz treće *Trichogramma* vrste, amplifikacija neće rezultirati PCR produktom.

Za svaki ispitivani uzorak pripremljeno je 23 µl PCR mastermiksa od sledećih reagenasa:

- 12,8µl dd H₂O
- 2,5 µl Thermopol PCR pufera (NEB),
- 1 µl MgCl₂(NEB)
- 0,5 µl prajmer ITS2 – forward (ThermoFisher Scientific)
- 0,5 µl prajmer ITS2 – Brassicae reverse (ThermoFisher Scientific)
- 0,5 µl prajmer ITS2 – Evanescens reverse (ThermoFisher Scientific)
- 0,2 µl Taq polimeraza (5 units/µl) (NEB)
- 5 µl dUTPs (NEB)

Za amplifikaciju ITS2 regiona koristili su se prajmeri „napred“(forward), 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3' lociran na 5.8S genu rDNK i dva reverse prajmera:

- Brassicae reverse 5'- CGACGTATCACA CTGCTCCT-3
- Evanescens reverse 5'- GCCGTCGTTACCTACTTTCG-3.

Za pripremanje 25 µl PCR reakcione smeše upotrebljeno je 2 µl izolovane DNK po uzorku i 23 µl pripremljenog PCR mastermiksa. Mastermiks je neposredno pre mešanja sa DNK materijalom postavljen u vortex radi boljeg mešanja upotrebljenih reagenasa.

Amplifikacija uzoraka je sprovedena sa dva kontrolna uzorka (pozitivna i negativna kontrola). Negativna kontrola sadržala je 23 µl PCR mastermiksa, dok je pozitivna kontrola pored 23 µl mastermiksa sadržala i 2 µl DNK *T. evanescens*. Pripremljena PCR reakciona smeša za uzorake i dve kontrole postavljena je u amplifikator, prethodno podešen za Multiplex PCR koji je obuhvata: preliminarnu denaturaciju na 95°C u trajanju od 3 minuta, za kojom sledi 38 ciklusa denaturacije u trajanju od 20sekundi na 95°C, otpuštanje (annealing) u trajanju od 20 sekundi na 55°C i ekstenziju (extension) u trajanju od 1 minuta na 68°C. Nakon poslednjeg ciklusa obavlja se finalna ekstenzija na 68°C u trajanju od 3 minuta.

Dužina dobijenih amplikona određena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu obojenim etidijum bromidom, dok su rezultati elektroforeze vizualizovani transiluminatorom.

3.4.1.2. Utvrđivanje genetičke varijabilnosti uzoraka *Trichogramma* sp.

Utvrđivanje intraspecijske varijacije identifikovanih uzoraka do nivoa vrste kao i njihovog filogenetskog porekla sprovedeno je amplifikacijom segmenta mitohonrijalne DNK (mtDNK) za citohrom c oksidazu I, tzv. COI gen. Amplifikacija COI gena sprovedena je za sve uzorke iz terenske kolekcije, pri čemu je PCR reakcija za svaki ispitivani uzorak sprovedena sa 25 µl reakcione smeše, pripremljene od 2 µl DNK ekstrakcije i 23 µl mastermiksa.

Za pripremanje PCR mastermiksa za pojedinačan uzorak upotrebljeni su sledeći reagensi:

- 11,3 µl H₂O
- 2,5 µl ThermoPol PCR Pufer (NEB)
- 5 µl dUTPs
- 2 µl 4% (v/v) BSA (NEB)
- 1 µl MgCl₂
- 0,5 µl LCO1490 (forward prajmer) (TFC)
- 0,5 µl HCO2198 (reverse prajmer) (TFC)
- 0,2 µl Taq polimeraza (NEB)

Amplifikacija COI gena sprovedena je po proceduri Heberta i sar. (2003), korišćenjem forward prajmera LCO 1490 - GTCAACAAATCATAAAGATATTGG i reverse prajmera HCO 2198 – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA (Folmer i sar., 1994), pri sledećim temperaturnim uslovima: preliminarna denaturacija na 94°C u trajanju od 2 minuta, praćena je sa 5 ciklusa od kojih se svaki ciklus sastoji od denaturacije u trajanju od 30 sekundi na 94°C,

otpuštanja u trajanju od 1 minute i 30 sekundi pri 45°C i ekstenzije u trajanju od 1 minuta na 72°C. Zatim je usledilo novih 35 ciklusa denaturacije od 30 sekundi pri 94°C, otpuštanja od 1 minute i 30 sekundi pri 51°C i ekstenzije od 1 minute pri 72°C. Nakon poslednjeg ciklusa usledila je finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 5 minuta. Efikasnost sprovedene amplifikacije potvrđena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Za uzorke za koje nisu dobijeni amplikoni, PCR reakcija je ponovljena sa većom dozom izolovane DNK, pa je 25 µl PCR reakcione smeše pripremljeno od 5 µl ukupne DNK i 20 µl mastermiksa.

Za pripremanje 20 µl PCR mastermiksa upotrebljeni su reagensi u sledećim dozama:

- 8,3 µl H₂O
- 2,5 µl Pufera
- 5 µl dUTPs
- 2 µl BSA
- 1 µl MgCl₂
- 0,5 µl LCO1490 (forward prajmer)
- 0,5 µl HCO2198 (reverse prajmer)
- 0,2 µl Taq polimeraza

Dobijeni amplikoni podvrgnuti su sekvenciranju na Institute for Integrative Genome Biology, Department of Biotechnology (University of California, Riverside). Sekvenciranju je prethodilo prečišćavanje COI amplikonai mešanje sa razblaženim forward i reverse COI prajmerima (1,6 mM) po prethodno opisanoj proceduri.

3.4.1.3. Identifikacija prisustva *Wolbachia* bakterije u *Trichogramma osicama*

Svi uzorci podvrgnuti molekularnoj identifikaciji, testirani su i na prisustvo *Wolbachia* endosimbiontske bakterije. Identifikacija prisustva ove bakterije sprovedena je amplifikacijom 16S regiona rDNK, specifičnog za *Wolbachia* bakteriju, korišćenjem prajmera i protokola po Werren i Windsor-u (2000). Za pojedinačan *Trichogramma* uzorak pripremljeno je 23 µl mastermiksa-a sa sledećim reagensima:

- 10,8 µl H₂O
- 2,5 µl TAE pufer
- 5 µl dNTPs
- 1,5 µl BSA (NEB)

- 1 µl MgCl₂
- 1 µl 438bp forward prajmer (TFC)
- 1 µl 438bp reverse prajmer (TFC)
- 0,2 µl Taq polimeraza

Za amplifikaciju 16S gena za svaki uzorak pripremljeno je 25 µl PCR smeše, sačinjene od 23 µl mastermiksa i 2 µl prethodno izolovane DNK ekstrakcije. Amplifikacija je sprovedena korišćenjem sledećih prajmera forward 5'-CATACCTATTCGAAGGGATAG-3' i reverse 5'-AGCTTCGAGTGAAACCAATTC-3'. PCR reakcija je sprovedena pri sledećim temperaturnim uslovima: preliminarna denaturacija na 95°C u trajanju od 2 minuta, zatim slede dva ciklusa denaturacije u trajanju od 2 minuta na 95°C, otpuštanja u trajanju od 1 minuta na 60°C i ekstenzije u trajanju od 1 minuta na 72°C. Sledi 38 ciklusa denaturacije u trajanju od 30 sekundi na 95°C, otpuštanja u trajanju od 1 minuta na 60°C i ekstenzije u trajanju od 45 sekundi na 72°C. Nakon poslednjeg ciklusa, obavlja se finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 5 minuta. Dobijeni PCR produkti razdvojeni su elektroforezom na 1% agaroznom gelu, obojenim etidijum bromidom.

Pošto detekcija 16S gena ne određuje da li je prisustvo *Wolbachia* bakterije naslednog karaktera ili je posledica ishrane na zaraženom domaćinu (*O. nubilalis*), sprovedena je amplifikacija *wsp* (*Wolbachia* surface protein gene) bakterijskog gena po proceduri koju su opisali Zhou i sar. (1998). Prisustvo *wsp* gena testirano je samo na uzorcima koji su se prethodno pokazali pozitivnim na bakterijski 16S gen.

Za amplifikaciju *wsp*, pripremljeno je 23 µl mastermiksa za svaki testirani uzorak:

- 9,8 µl H₂O
- 2,5 µl Thermopol pufera (NEB)
- 5 µl dUTPs
- 1 µl 2% (v/v) BSA (NEB)
- 1,5 µl MgCl₂
- 2 µl forward *wsp* prajmer (TFC)
- 2 µl reverse *wsp* prajmer (TFC)
- 0,2 µl Taq polimeraza

Za svaki ispitivani uzorak pripremljeno je 25 µl PCR reakciona smeše, sačinjene od 23 µl mastermiksa i 2 µl prethodno izolovane DNK. Za PCR reakciju upotrebljeni su sledeći prajmeri: prajmer „napred“ (forward) 5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC-3' i

prajmer „nazad“ (reverse) 5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3' (Zhou i sar., 1998). Amplifikacija *wsp* gena sprovedena je pri sledećim temperaturnim uslovima: preliminarna denaturacija na 94°C u trajanju od 2 minuta, praćena sa 38 ciklusa od kojih se svaki ciklus sastoji od denaturacije u trajanju od 1 minute na 94°C, otpuštanja u trajanju od 1 minute na 55°C i ekstenzije u trajanju od 1 minuta i 20 sekundi na 72°C. Nakon poslednjeg ciklusa obavljena je finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 minuta. Dužina dobijenih amplikona određena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu obojenim etidijum bromidom, dok su rezultati elektroforeze vizualizovani transiluminatorom.

Dobijeni PCR produkti su prečišćeni sa ExoProStar komercijalnim kitovima po navedenoj proceduri. Prečišćenim amplikonima su dodati razblaženi forward i reverse *wsp* prajmeri (1,6 mM) u odnosu 1:4, a zatim su amplikoni podvrgnuti sekvenciranju na Integrative Genome Biology (University of California, Riverside).

3.4.2. Molekularna identifikacija uzoraka prikupljenih u 2017. godini

Jedinke uzorkovane u 2017. godini, podvrgnute su molekularnoj identifikaciji amplifikacijom ITS2 regiona rDNK. Pored amplifikacije ITS2 segmenta sa univerzalnim prajmerima za vrste iz roda *Trichogramma*, sproveden je i Multiplex PCR sa specifičnim prajmerima za amplifikaciju ITS2 segmenta.

Molekularna identifikacija uzorkovanih *Trichogramma* jedinki odvijala se u sledećim fazama:

- DNK ekstrakcija
- Amplifikacija ITS2 regiona rDNK (PCR)
- Elektroforeza proizvoda amplifikacije
- Obrada i tumačenje rezultata molekularnih analiza

DNK ekstrakcija

DNK ekstrakcija izvršena je pomoću neinvazivne HotShot metode po prethodno opisanoj proceduri (Truett i sar., 2000). Za DNK ekstrakciju upotrebljeni su sledeći reagensi: 100 mM NaOH, 50 mM Na₂ EDTA, 40 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich). Iz svakog uzorka osica iz odgovarajućeg parazitiranog jajnog legala kukuruznog plamenca izdvojene su po dve jedinke *Trichogramma* sp. (ženke) koje su podvrgnute DNK ekstrakciji, odnosno jedna jedinka u slučaju gde je iz uzorka jajnog legla dobijena samo jedna osica. Izolovana DNK iz svake jedinke konzervirana je u zasebnim falconima, obeleženim brojevima i uskladištena u zamrzivaču na -20°C.

Amplifikacija ITS2 regiona:

Izolacijom DNK materijala, pristupilo se amplifikaciji ITS2 regiona rDNK, pomoću univerzalnih prajmera za vrste iz roda *Trichogramma*. PCR reakcija najpre je sprovedena korišćenjem DNK materijala iz po jedne *Trichogramma* ženke iz svakog uzorkovanog parazitiranog jajnog legla.

Za svaki ispitivani uzorak pripremljeno je 23 µl PCR mastermiksa od sledećih reagenasa:

- 13,3 µl dd H₂O
- 8,7 µl DreamTaq PCR mastermiks (ThermoScientific)
- 0,5 µl prajmer ITS2 – forward (ThermoScientific)
- 0,5 µl prajmer ITS2 – reverse (ThermoScientific)

Za amplifikaciju ITS2 regiona koristili su se forward prajmer 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3' i reverse prajmer 5'-GTCTTGCCTGCTCTGAG-3. Za pripremanje 25 µl PCR reakcione smeše upotrebljeno je 2 µl izolovane DNK po uzorku i 23 µl pripremljenog PCR mastermiksa. Mastermiks je neposredno pre mešanja sa DNK materijalom postavljen u vortex radi boljeg mešanja upotrebljenih reagenasa. Amplifikacija uzoraka sprovedena je sa dva kontrolna uzorka (dve negativne kontrole). Negativna kontrola sadržala je 23 µl PCR mastermiksa, bez izolovanog DNK materijala. Pripremljena PCR reakciona smeša uzoraka postavljena je u amplifikator, prethodno podešen za amplifikaciju ITS2 regiona.

Amplifikacija započinje preliminarnom denaturacijom na 95°C u trajanju od 3 minuta, pa sledi 37 ciklusa: denaturacije u trajanju od 45 sekundi na 92°C, otpuštanja u trajanju od 45 sekundi na 53°C i ekstenzije u trajanju od 1 minuta i 15 sekundi na 72°C. Nakon poslednjeg ciklusa, obavlja se finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 3 minuta. Dužina amplikona dobijenih PCR reakcijom određena je elektroforezom na 1% agaroznom gelu, dok su rezultati elektroforeze vizualizovani transiluminatorom (Vilber). Elektroforeza je sprovedena po prethodno opisanoj proceduri tokom identifikacije uzoraka prikupljenih u 2016. godini.

MultiPlex PCR:

Multiplex PCR metoda sprovedena je korišćenjem izolovane DNK iz svih jedinki osica. Za svaki ispitivani uzorak pripremljeno je 23 µl PCR mastermiksa od sledećih reagenasa:

- 9,8 µl dd H₂O
- 8,7 µl DreamTaq PCR mastermiks (ThermoScientific)
- 0,5 µl prajmer ITS2 – forward (RTC)
- 0,5 µl prajmer ITS2Brassicae reverse (RTC)
- 0,5 µl prajmer ITS2Evanescens reverse (RTC)

Za amplifikaciju su se koristili sledeći prajmeri:

- ITS2 forward 5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3',
- ITS2 brassicae reverse 5'- CGACGTATCACACTGCTCCT-3
- ITS2 evanescens reverse 5'- GCCGTCGTTACCTACTTTTCG-3

Za pripremanje 25 µl PCR reakcione smeše upotrebljeno je 2 µl izolovane DNK po uzorku i 23 µl pripremljenog PCR mastermiksa. Mastermiks je neposredno pre mešanja sa DNK materijalom postavljen u vortex radi boljeg mešanja upotrebljenih reagensa. Amplifikacija uzoraka sprovedena je sa dva kontrolna uzorka (pozitivna i negativna kontrola). Negativna kontrola sadržala je 23 µl PCR mastermiksa, dok je pozitivna kontrola pored 23 µl mastermiksa sadržala i 2 µl DNK *T. evanescens*. Pripremljena PCR reakciona smeša za svakog uzoraka postavljena je u amplifikator prethodno podešen za Multiplex PCR reakciju. Amplifikacija započinje preliminarnom denaturacijom na 95°C u trajanju od 3 minuta, a zatim sledi 38 ciklusa denaturacije u trajanju od 20 sekundi na 95°C, otpuštanja u trajanju od 20 sekundi na 55°C i ekstenzije u trajanju od 1 minuta na 68°C. Nakon poslednjeg ciklusa obavlja se finalna ekstenzija na 68°C u trajanju od 3 minuta.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Rezultati monitoringa kukuruznog plamenca na teritoriji Kikinde

Monitoring adulta kukuruznog plamenca svetlosnim klopama, na dva lokaliteta na teritoriji opštine Kikinda (Kikinda i Banatska Topola) tokom 2016 i 2017 godine, pokazao je različitu brojnost populacija ove štetočine (Prilozi 1 i 2). U toku 2016.godine utvrđena je znatno veća aktivnost kukuruznog plamenca, jer je na praćenim lokalitetima u toku sezone registrovano ukupno 65.631 jedinki plamenca, dok je zbirni ulov na svetlosnim klopama u 2017. godini iznosio 9.183 adulta.

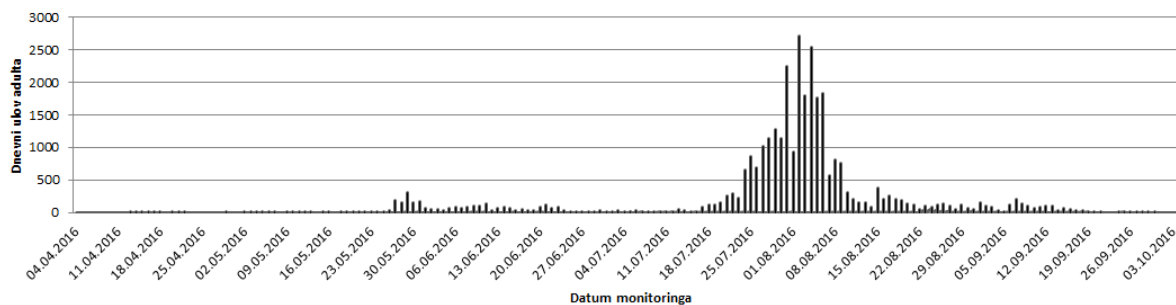
Pored značajnih razlika u brojnosti ukupno sakupljenih jedinki u klopama u toku sezone, koja je na lokalitetu Kikinda bila 4,9 puta niža, a na lokalitetu Banatska Topola 12,2 puta niža u 2017. u odnosu na 2016. godinu, u toku obe sezone, na oba lokaliteta je zapažena pojava tri generacije ove štetočine (Grafici 1 do 4).

U toku 2016. godine zabeležena je relativno niska aktivnost prve generacije plamenca, pri čemu je maksimum leta na oba praćena lokaliteta registrovan krajem maja meseca sa dnevnim ulovom od 187 adulta na lokalitetu Kikinda (dana 27. maja) i 134 adulta na lokalitetu Banatska Topola (28. maja). Maksimum leta druge generacije plamenca na lokalitetu Kikinda u 2016. godini beleži se početkom avgusta meseca sa dnevnim ulovom od 2705 jedinki (2. avgusta), dok je maksimum leta druge generacije na lokalitetu Banatska Topola registrovan krajem jula meseca sa dnevnim ulovom od 2652 jedinke (dana 27. jula). Maksimum leta treće generacije na oba praćena lokaliteta registrovan je početkom septembra (dana 7. septembra na oba lokaliteta), sa dnevnim ulovom od 213 jedinki plamenca na lokalitetu Banatska Topola, odnosno 195 jedinki na lokalitetu Kikinda.

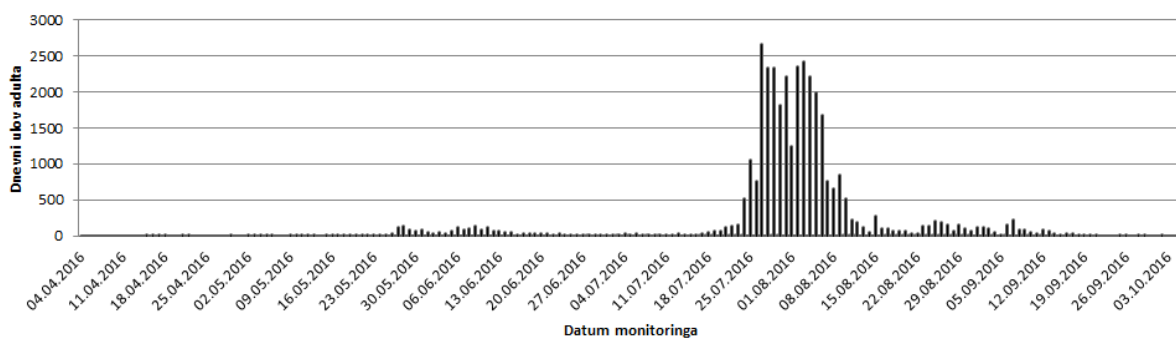
Tokom 2017.godine na oba praćena lokaliteta zabeležena je manja brojnost adulta na svetlosnim klopama u odnosu na prethodnu godinu, ali je s druge strane brojnost prve generacije bila veća nego u prethodnoj godini, a pikovi maksimalnih brojnosti pojedinih generacija su jasnije izraženi (Grafici 3 i 4). Tokom 2017. godine, maksimum leta prve generacije na lokalitetu Kikinda registrovan je krajem maja meseca (31. maja) sa dnevnim ulovom od 295 adulta, odnosno početkom juna meseca (4. juna) na lokalitetu Banatska Topola sa dnevnim ulovom od 232 adulta. Dakle, dnevni maksimum brojnosti adulta prve generacije je u 2017.godini na oba praćena lokaliteta imao veće vrednosti nego u prethodnoj, 2016. godini. Maksimum leta druge generacije registrovan je krajem jula meseca na lokalitetu

Banatska Topola (dana 30. jula) sa dnevnim ulovom od 308 adulta, odnosno početkom avgusta (dana 1. avgusta) sa dnevnim ulovom od 435 adulta na lokalitetu Kikinda. Na oba praćena lokaliteta u 2017. godini maksimalne vrednosti dnevnog ulova adulta druge generacije u svetlosnim klopkaama su bile višestruko manje u odnosu na 2016. godinu (u Kikindi 6,2 puta, a u Banatskoj Topoli 7,8 puta). Maksimum brojnosti treće generacije plamenca od 125 jedinki u klopci (dana 10.09.2017.) na lokalitetu Kikinda je u 2017. godini imao 1,6 puta nižu vrednost u odnosu na prethodnu godinu, dok je na lokalitetu Banatska Topola vrednost maksimalne brojnosti od 28 jedinki (dana 11.09.2019.) bila 7,6 puta niža u odnosu na maksimalnu brojnost treće generacije u prethodnoj godini. Rezultati monitoringa adulta kukuruznog plamenca svetlosnim klopkaama sprovedenim u toku dve sezone, pokazali su vrlo sličnu dinamiku leta imaga tokom sve tri generacije, bez obzira na razlike u brojnosti populacija zabeleženoj u različitim godinama. Pored toga, periodi maksimalnih brojnosti adulta u pojedinim generacijama su se na oba lokaliteta skoro u potpunosti poklapali u svakoj sezoni, pri čemu su maksimumi na oba lokaliteta beleženi ili istog dana ili u razmaku ne dužem od 6 dana. Na osnovu dvogodišnjih rezultata praćenja brojnosti adulta u svetlosnim klopkaama, utvrđeno je da se maksimum leta prve generacije kukuruznog plamenca dešava krajem maja i početkom juna (27. i 28. maja 2016., odnosno 31. maja i 4. juna 2017. godine), druge generacije krajem jula i početkom avgusta (27. jula i 2. avgusta 2016., odnosno 30. jula i 1. avgusta 2017. godine), a treće generacije u prvoj dekadi septembra meseca (7. septembra u 2016, odnosno 10. i 11. septembra 2017. godine).

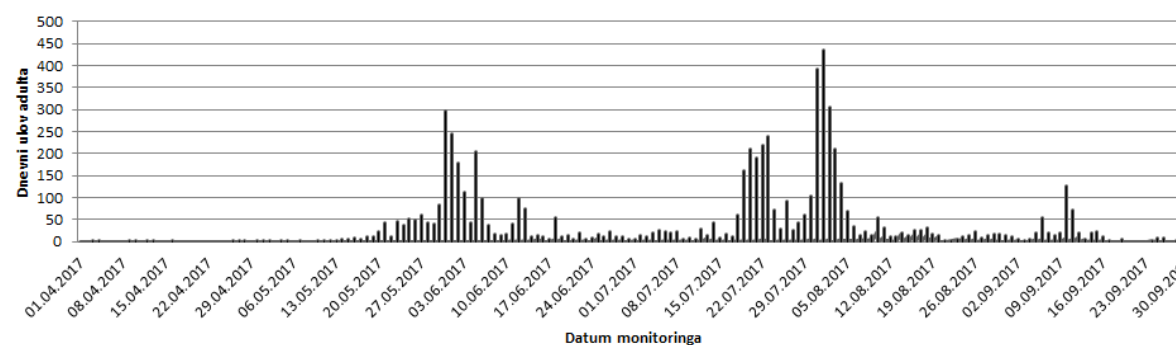
Najveća brojnost populacije adulta u obe godine i na oba lokaliteta zabeležena u letnjem delu sezone, krajem jula i u prvoj polovini avgusta meseca (Graf. 1-4, Prilozi 1 i 2), odnosno u periodu koji odgovara letu druge generacije kukuruznog plamenca. Posmatranjem dinamike leta imaga kukuruznog plamenca, odnosno utvrđivanjem maksimuma leta svake generacije opredeljeni su adekvatni momenti za sprovođenje vizuelnih pregleda useva kukuruza radi određivanja stope parazitiranosti položenih jajnih legala kukuruznog plamenca i njihovog sakupljanja radi odgajivanja jedinki parazitoida. U 2016. i 2017. godini nisu registrovana parazitirana jajna legla kukuruznog plamenca tokom aktivnosti prve generacije štetočine, dok je u obe praćene godine zabeležena visoka aktivnost *Trichogramma* parazitoida tokom aktivnosti druge generacije plamenca. U 2017. godini takođe je registrovana značajna aktivnost *Trichogramma* parazitoida tokom leta treće generacije plamenca.



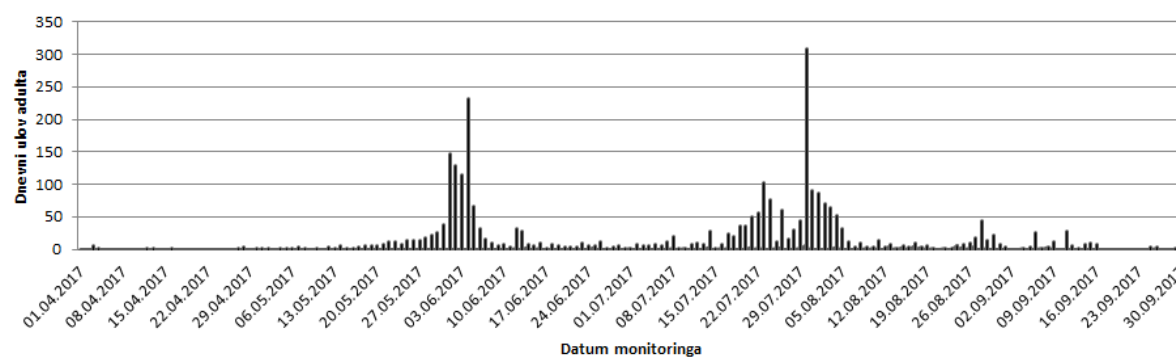
Grafik 1. Dinamika leta kukuruznog plamenca na lokalitetu Kikinde u 2016. godini (Ivezić, 2016).



Grafik 2. Dinamika leta kukuruznog plamenca na lokalitetu Banatska Topola u 2016. godini (Ivezić, 2016).



Grafik 3. Dinamika leta kukuruznog plamenca na lokalitetu Kikinda u 2017. godini (Ivezić, 2017).



Grafik 4. Dinamika leta kukuruznog plamenca na lokalitetu Banatska Topola u 2017. godini (Ivezić, 2017).

4.2. Rezultati morfološke i molekularne identifikacije jedinki uzorkovanih u 2016. godini

Praćenjem ovipozicije ženki kukuruznog plamenca na 5 različitih lokaliteta u kikindskom regionu tokom 2016. godine, pregledano je ukupno 150 jajnih legala ove štetočine. Monitoring sproveden na teritoriji opštine Kikinda u trećoj dekadi jula, prvoj i drugoj dekadi avgusta pokazuje da su registrovana jajna legala kukuruznog plamenca položena od strane ženki II generacije *O. nubilalis*. Od ukupnog broja pregledanih registrovano je 97 parazitiranih jajnih legala, što ukazuje na izrazito visoku stopa parazitizma, koja se kretala u opsegu od 40% do 100% u zavisnosti od lokaliteta i datuma pregleda (Tab.1). U periodu prikupljanja uzoraka prosečna stopa parazitizma po lokalitetu iznosila je od 51,52% (lokalitet Stankić) do 84,62% (lokalitet Banatsko Veliko Selo), dok je prosečna stopa parazitizma za region opštine Kikinda u posmatranom periodu iznosila 64,67% (Tabela 1).

Za potrebe morfološke i molekularne identifikacije parazitoidea na teritoriji opštine Kikinde uzorkovano je 28 parazitiranih jajnih legala *O. nubilalis*, sakupljenih na pet lokaliteta u periodu od kraja jula do druge dekade avgusta 2016. godine, iz kojih su se razvile osice *Trichogramma* sp. (Tabela 2).

Na osnovu primenjenih ključeva za identifikaciju, sve jedinke uzorkovane u 2016. godini podvrgnute su morfološkoj identifikaciji i determinisane kao predstavnici roda *Trichogramma*. Molekularna identifikacija, sprovedena amplifikacijom ITS2 regiona rDNK, pokazala je da sve jedinke uzorkovane iz 28 parazitiranih jajnih legala kukuruznog plamenca pripadaju rodu *Trichogramma*, dok je sekvencioniranjem dobijenih amplikona i analizom sekvenci baza na ITS2 regionu utvrđeno prisustvo dve vrste iz roda *Trichogramma*: *T. brassicae* i *T. evanescens*.

Amplifikacija ITS2 regiona za uzorke osica označenih ALEX1 do ALEX28 sprovedena je najpre korišćenjem univerzalnih ITS2 prajmera za *Trichogramma* spp., dok je dužina dobijenih amplikona određena elektroforezom na 1% agaroznog gelu (Slike 41, 42 i 43).

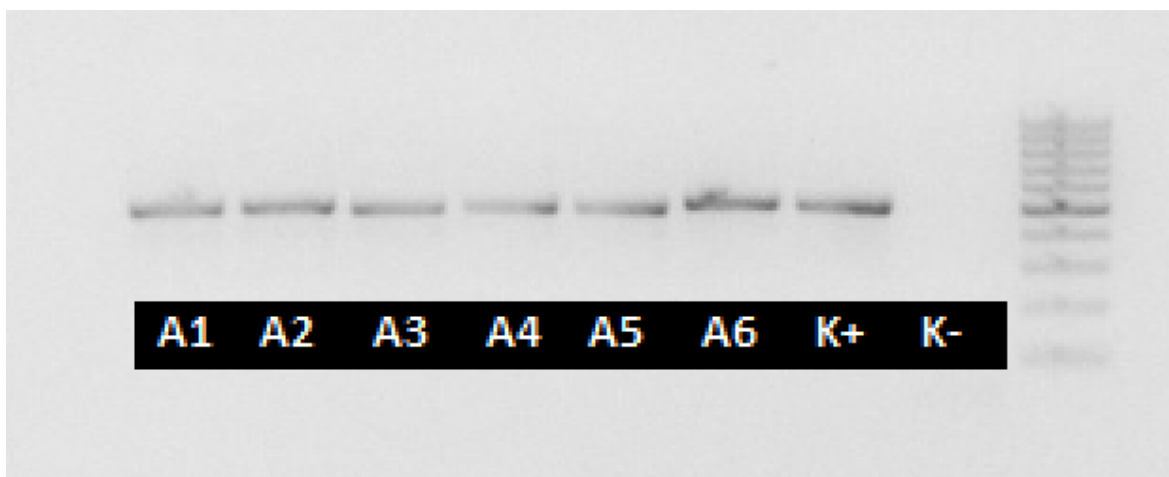
Razdvajanjem dobijenih PCR produkata elektroforezom, utvrđeno je da dužina amplikona iznosi približno 500 baznih parova, što inicijalno odgovara dužini ITS2 regiona kod vrsta iz roda *Trichogramma*.

Tabela 1. Parazitiranost jajnih legala *O. nubilalis* na teritoriji opštine Kikinda u 2016. godini

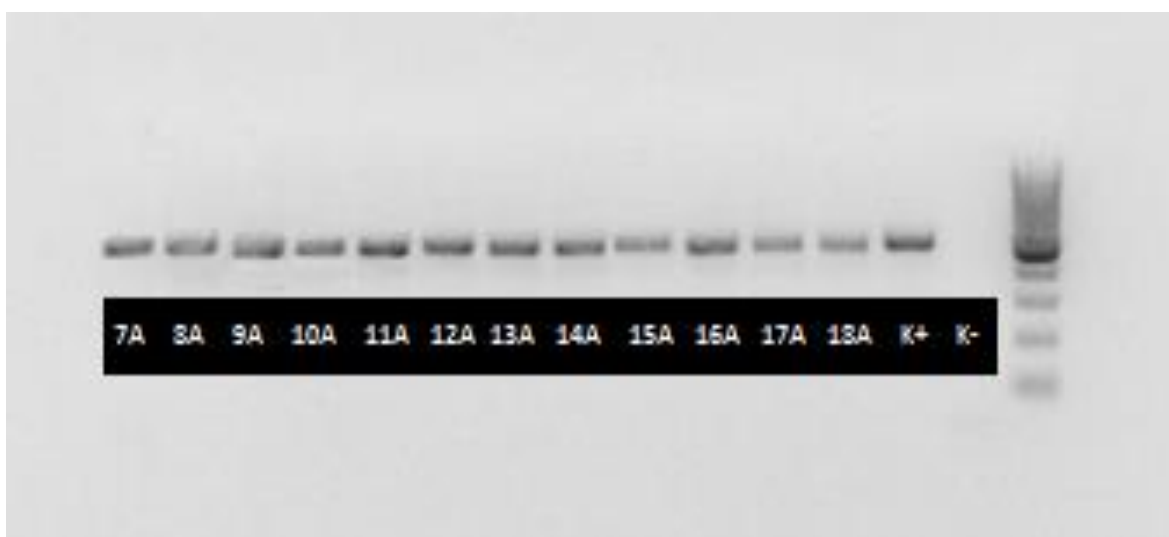
Lokalitet	Koordinate (geografska širina i dužina)	Datum	Broj jajnih legala <i>O. nubilalis</i>		Stopa parazitiranosti (%)
			Pregledana	Parazitirana	
Kinđa	45°46'59.133"N 20°27'27.432"E	27.07.2016.	8	6	75.00
		3.8.2016	7	4	57.14
		9.08.2016.	29	17	58.62
		Ukupno	44	27	61.36
Stankić	45°51'30.756"N 20°29'40.000"E	3.08.2016.	6	3	50.00
		9.08.2016.	22	12	54.55
		17.08.2016.	5	2	40.00
		Ukupno	33	17	51.52
Banatska Topola	45°44'6.004"N 20°29'59.792"E	3.08.2016	6	3	50.00
		9.08.2016.	11	6	54.55
		17.08.2016.	6	6	100.00
		Ukupno	23	15	65.22
Nakovo	45°51'33.264"N 20°32'40.694"E	3.08.2016.	8	4	50.00
		9.08.2016.	9	6	66.67
		12.08.2016.	12	11	91.67
		17.08.2016.	8	6	75.00
		Ukupno	37	27	72.97
Banatsko Veliko Selo	45°50'10.056"N 20°37'28.506"E	3.08.2016.	4	3	75.00
		9.08.2016.	2	1	50.00
		17.08.2016.	7	7	100.00
		Ukupno	13	11	84.62
Ukupno za region Kikinde			150	97	64.67

Tabela 2. Podaci o poreklu uzoraka jedinki *Trichogramma* spp. odgajenih iz jajnih legala *O. nubilalis* sakupljenih na teritoriji opštine Kikinda u 2016 godini i podvrgnutih molekularnoj identifikaciji.

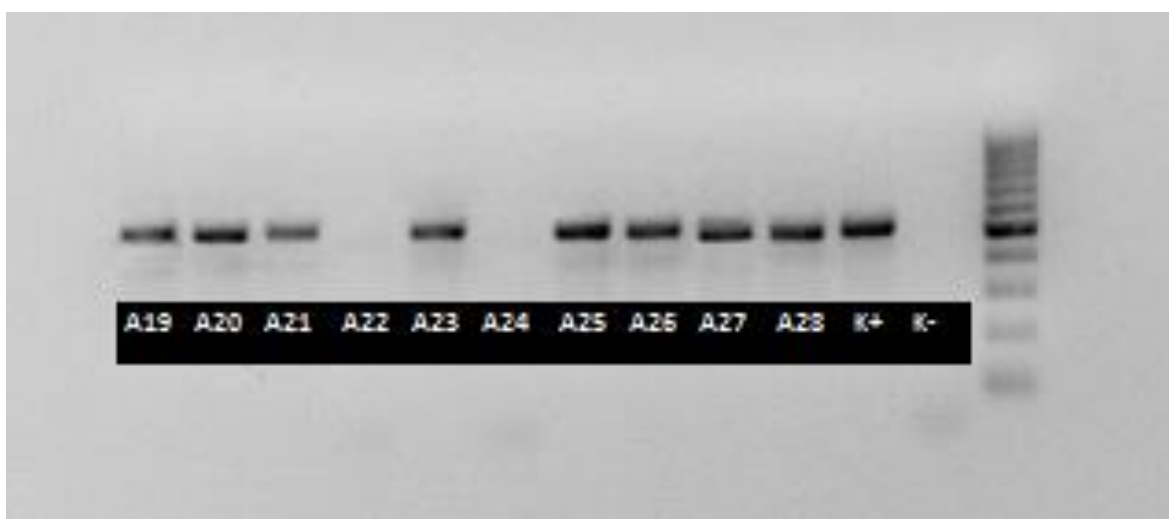
Lokalitet	Datum	Akronimi parazitiranih gajenih jajnih legala <i>O. nubilalis</i>	Odgajene jedinke <i>Trichogramma</i> spp.	
			Broj	Akronim izolovane DNK
Kinđa	27.07.2016.	PJL1	1	ALEX1
	3.8.2016	PJL2 do PJL4	3	ALEX2 do ALEX4
Stankić	9.08.2016.	PJL5 do PJL12	8	ALEX5 do ALEX12
Banatska Topola	9.08.2016.	PJL13-PJL16	4	ALEX13 do ALEX16
Nakovo	12.08.2016.	PJL17 do PJ22	6	ALEX17 do ALEX22
Banatsko Veliko Selo	17.08.2016.	PJL23 do PJL28	6	ALEX23 do ALEX28
Ukupno za region Kikinde		PJL1 do PJL28	28	ALEX1 do ALEX28



Slika 41. Elektroforegram uzoraka *Trichogramma* osica ALEX 1 do ALEX 6 (na slici A1 do A6) sa pozitivnom (K+, *T. pretiosum*) i negativnom (K-) kontrolom.



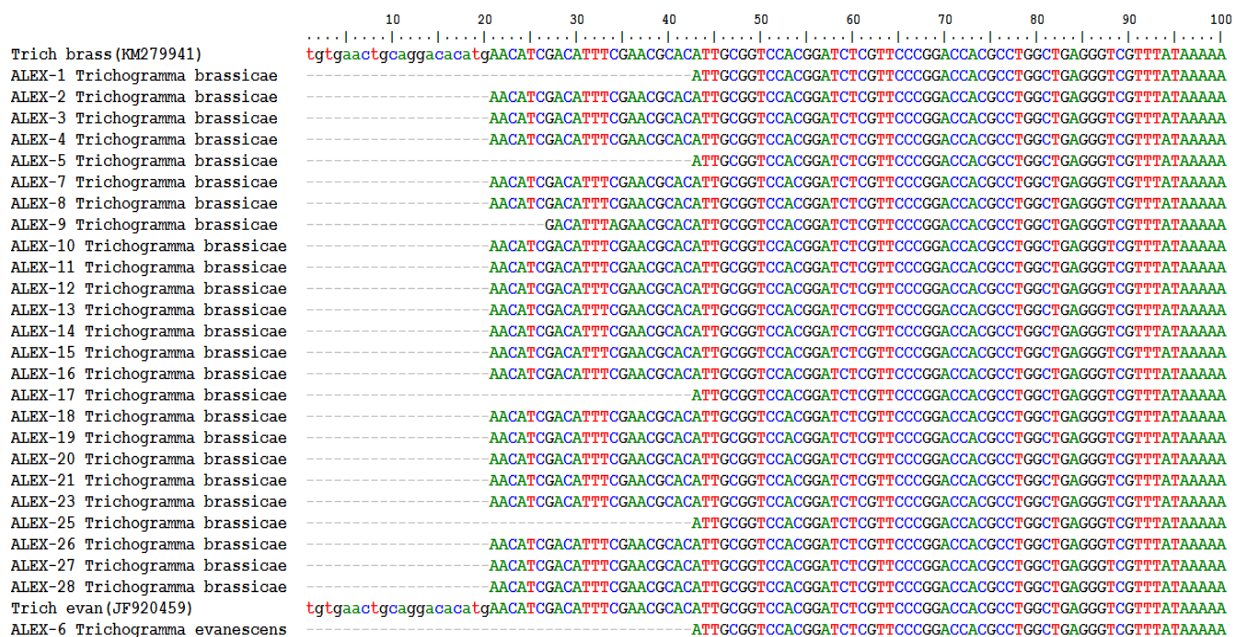
Slika 42. Elektroforegram uzoraka *Trichogramma* osica ALEX7 do ALEX18 (na slici 7A do 18A) sa pozitivnom (K+, *T. pretiosum*) i negativnom (K-) kontrolom.



Slika 43. Elektroforegram uzoraka *Trichogramma* osica ALEX19 do ALEX28 (na slici A19 do A28) sa pozitivnom (K+, *T. pretiosum*) i negativnom (K-) kontrolom.

Od 28 DNK uzoraka, upotrebljenih za amplifikaciju ITS2 regiona, 26 uzorka je rezultiralo PCR produktom. Dobijeni amplikoni (iz 26 uzoraka) podvrgnuti su sekvenciranju, dok je za uzorke za koje nisu dobijeni amplikoni (uzorci ALEX22 i ALEX24), ponovljen postupak amplifikacije korišćenjem 5 µl izolovane DNK po uzorku i 20 µl PCR mastermiksa. Pošto amplifikacija uzoraka ALEX 22 (lokalitet Nakovo) i ALEX 24 (Lokalitet Banatsko Veliko Selo) ni sa 5 µl izolovane DNK nije rezultirala PCR produktom, ovi uzorci nisu podvrgnuti proceduri sekvenciranja.

Rezultati sekvencioniranja ITS2 segmenta poravnati su ručno sa programom BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.2.5), a zatim su upoređeni korišćenjem BLAST programa sa poznatim sekvencama u GenBank onlajn (NCBI-National Center for Biotechnology Information) (Prilog 3). Uz pomoć BLAST pretrage, 25 od 26 ispitivanih uzoraka prikupljenih u regionu Kikinde u 2016. godini, identifikovano je kao *T. brassicae* (pristupni broj KM279941) dok je samo jedan uzorak sa lokaliteta Stankić (Alex 6) identifikovan kao *T. evanecens* (pristupni broj JF920459) (Slike 44-49).



Slika 44. Redosled nukleotida (0-100) na ITS2 regionu uzorkovanih jedinki u 2016. godini

	510	520	530	540	550
Trich brass (KM279941)	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-1 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-2 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-3 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-4 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-5 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAG		
ALEX-7 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-8 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-9 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-10 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-11 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-12 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-13 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-14 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-15 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-16 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-17 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAG		
ALEX-18 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-19 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-20 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-21 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-23 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-25 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC			
ALEX-26 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC			
ALEX-27 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
ALEX-28 <i>Trichogramma brassicae</i>	GCTAGCTCGAA	TTTTTGC	TGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC
Trich evan (JF920459)	GCTAGCTCGAAGCTTTTTTGC	CTTGAACGAGT	CTTTTTTTCTCGAT	CGACGAC	
ALEX-6 <i>Trichogramma evanescens</i>	GCTAGCTCGAAGCTTTT				

Slika 49. Redosled nukleotida (500-550) na ITS2 regionu uzorkovanih jedinki u 2016. godini.

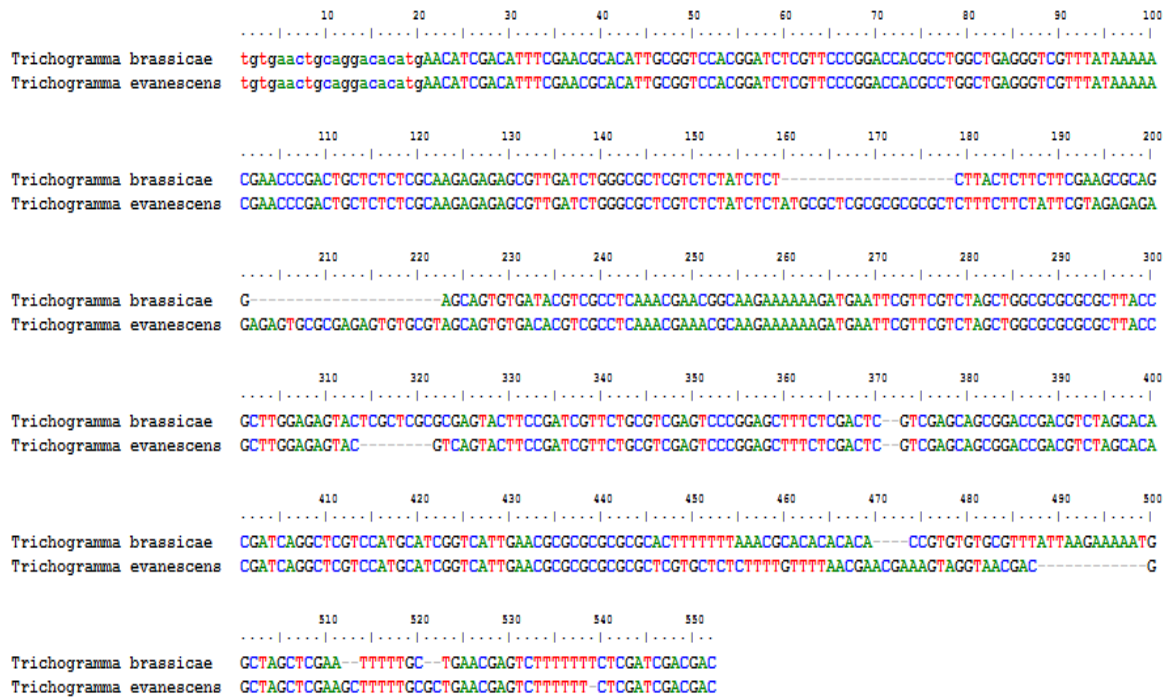
4.2.1. Specifični prajmeri za identifikovane vrste roda *Trichogramma*

Analizom rezultata sekvencioniranja zapažena je određena razlika u redosledu baznih parova na ITS2 regionu kod *T. brassicae* i *T. evanescens* (Slika 50). Na osnovu utvrđene razlike u sekvencama nukleotida na ITS2 regionu dizajnirani su specifični prajmeri za *T. brassicae* i *T. evanescens*, pomoću kojih se amplifikacijom ITS2 regiona dužina amplikona kod ove dve vrste međusobno razlikuje. Elektroforezom takvih amplikona registruje se razlika u broju baznih parova između *T. brassicae* i *T. evanescens* i time se u procesu molekularne identifikacije eliminiše proces sekvenciranja. Konstruisano je dva seta prajmera.

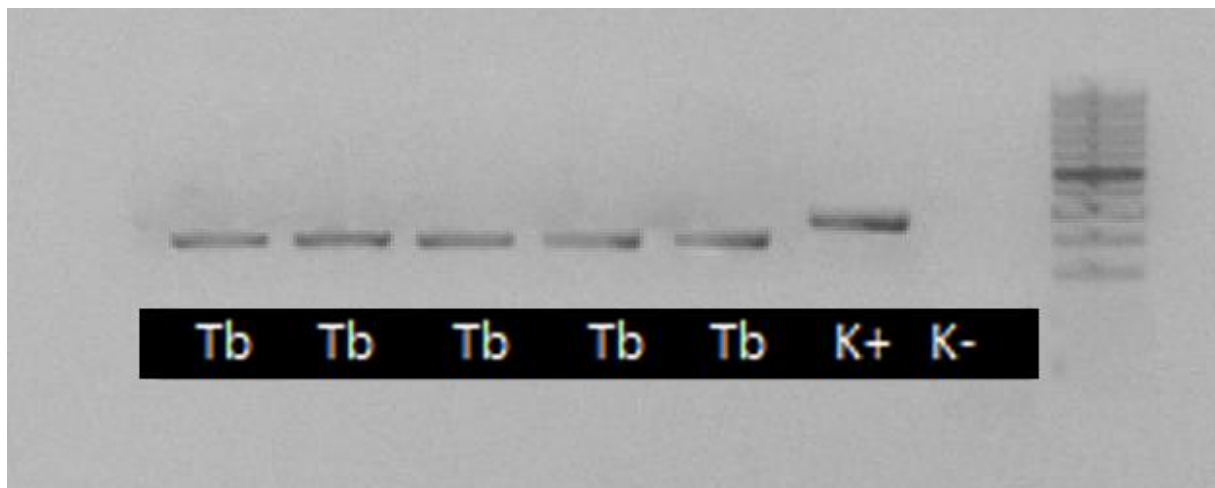
Specifični prajmer za PCR:

Kao forward prajmer koristio se univerzalni forward prajmer za amplifikaciju ITS2 regiona kod *Trichogramma* spp., dok je reverse prajmer dizajniran na osnovu razlike u redosledu nukleotida na ITS2 regionu kod *T. brassicae* i *T. evanescens*. Ta razlika je naročito izražena u ITS2 regionu između 159. i 223. nukleotida (Slika 50). Ovako dizajniran prajmer (5'- GTTCGTTTGAGGCGACGTRT-3') se koristi kao reverse prajmer za obe *Trichogramma* vrste pri čemu je rezultat amplifikacije znatno kraći PCR produkt. U slučaju amplifikacije ITS2 regiona kod *T. evanescens*, dobija se PCR produkt od 251 baznih parova, dok se u slučaju *T. brassicae* dobija PCR produkt od 211 baznih parova. Ovakva razlika nije jasno izražena nakon elektroforeze amplikona. Naime, elektroforegram (Slika 51) dobijenih PCR produkata ne pokazuje jasno izraženu razliku u broju baznih parova kod *T. brassicae* i *T. evanescens*, odnosno razlika u dužini amplikona nije dovoljno očigledna za laku identifikaciju

vrsta. Stoga je dizajniran drugi set prajmera pomoću kojih je primenjena Multiplex PCR metoda, istovremenim korišćenjem reverse prajmera za *T. brassicae* i reverse prajmera za *T. evanescens* u istom mastermiksi. Posebni reverse prajmeri za obe vrste dizajnirani su kako bi se prilikom amplifikacije dobijeni PCR produkti značajnije razlikovali u broju baznih parova.



Slika 50. Razlika u rasporedu baznih parova između *T. brassicae* i *T. evanescens*.

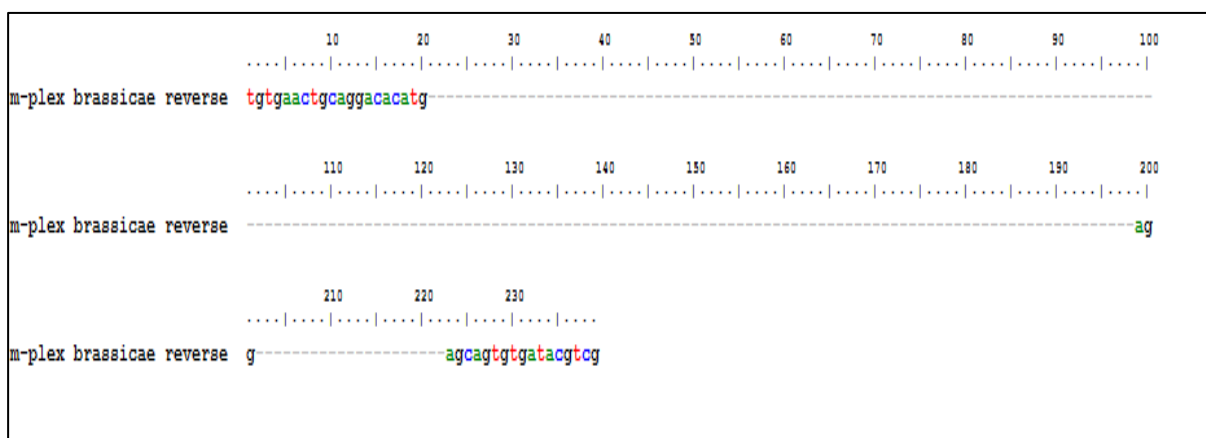


Slika 51. Elektroforegram 5 amplikona *T. brassicae* dobijenih korišćenjem univerzalnog reverse prajmera gde je *T. evanescens* pozitivna kontrola (K+).

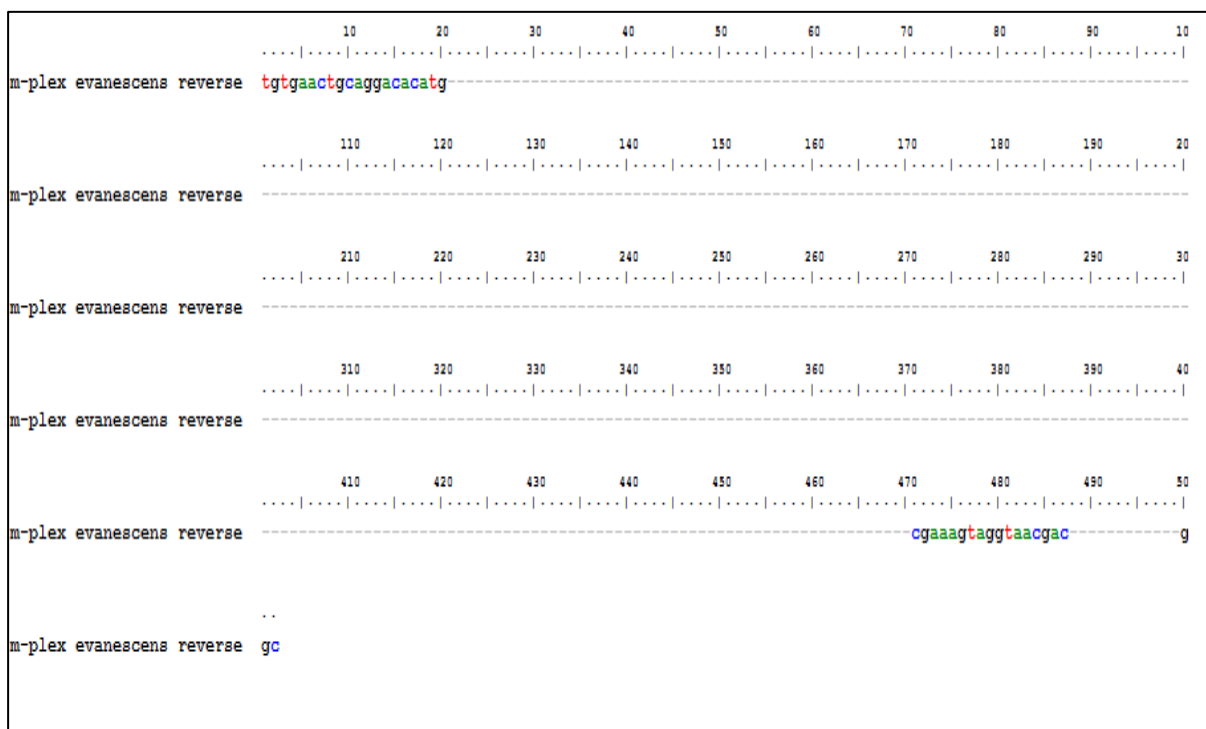
Specifični prajmeri za Multiplex PCR

Za ovu metodu dizajnirana su dva reverse prajmera: reverse prajmer za *T. brassicae* (5'- CGACGTATCACACTGCTCCT-3') i reverse prajmer za *T. evanescens* (5'-

GCCGTCGTTACCTACTTTTCG-3'). Kao forward prajmer koristi se univerzalni forward prajmer za amplifikaciju ITS2 regiona kod *Trichogramma* spp. Za *T. brassicae* dizajniran je reverse prajmer koji se sastoji od baznih parova karakterističnih za ITS2 region kod *T. brassicae* (Slika 52). Primenom ovakvog reverse prajmera dobija se ampikon od 199 baznih parova. Ukoliko se ovakav reverse prajmer primeni za amplifikaciju ITS2 regiona kod *T. evanescens*, ne dobija se PCR product. Za *T. evanescens* dizajniran je reverse prajmer koji se sastoji od baznih parova karakterističnih za ITS2 region kod *T. evanescens* (Slika 53). Primenom ovakvog reverse prajmera, ampikon će se sastojati od 480 baznih parova. Ukoliko je DNK ekstrakovana iz *T. brassicae*, primenom reverse prajmera specifičnog za *T. evanescens* ne dobija se PCR produkt.

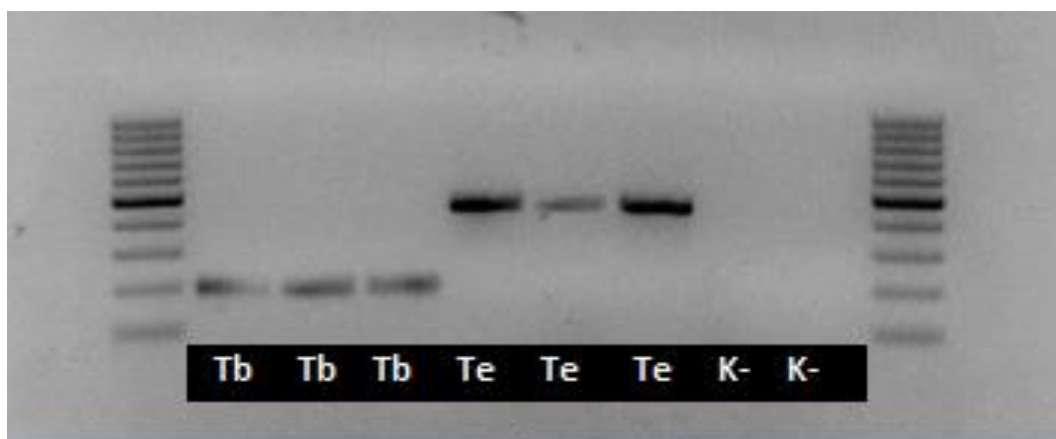


Slika 52. Reverse prajmer za amplifikaciju ITS2 regiona kod *T. brassicae*.



Slika 53. Reverse prajmer za amplifikaciju ITS2 regiona kod *T. evanescens*.

Multiplex PCR uključuje primenu oba prajmera istovremeno, odnosno podrazumeva pripremu PCR mastermiksa sa dva reverse prajmera. PCR produkti dobijeni amplifikacijom DNK ekstrahovane iz vrsta *T. brassicae* i *T. evanescens*, se u ovakvom slučaju značajnije razlikuju po broju nukleotida, te se jasno vizualizuje, odnosno determiniše razlika između *T. evanescens* i *T. brassicae* (Slika 54). Ukoliko ispitivana jedinka pripada trećoj-nepoznatoj *Trichogramma* vrsti, amplifikacija ITS2 regiona sa ovakvim prajmerima neće rezultirati PCR produktom.



Slika 54. Multiplex PCR sa tri uzorka *T. brassicae* (Tb), tri uzorka *T. evanescens* (Te) i negativnom kontrolom (K-).

Primenjena Multiplex PCR metoda sadrugim setom dizajniranih prajmera jasno pokazuje razliku u dužini amplikona, dobijenih amplifikacijom ukupne DNK izolovane iz *T. brassicae* i *T. evanescens*.

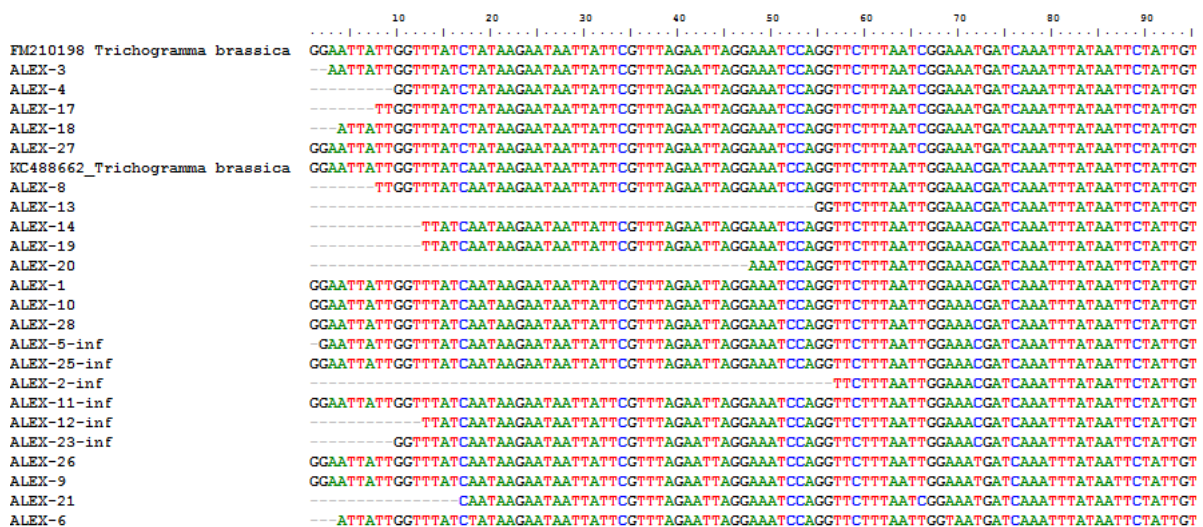
Obzirom da su rezultati sekvenciranja PCR produkta, dobijenih amplifikacijom ITS2 regiona jedinki uzorkovanih u kikindskom regionu, pokazali da se u prirodnim populacijama *Trichogramma* spp. *T. brassicae* ističe kao dominantna vrsta (svega jedan uzorak je identifikovan kao *T. evanescens*), primena Multiplex PCR metode sa specifičnim reverse prajmerima za *T. brassicae* i *T. evanescens* značajno smanjuje kompleksnost molekularne identifikacije *Trichogramma* parazitoida.

4.2.2. Genetička varijabilnosti uzoraka *Trichogramma* spp.

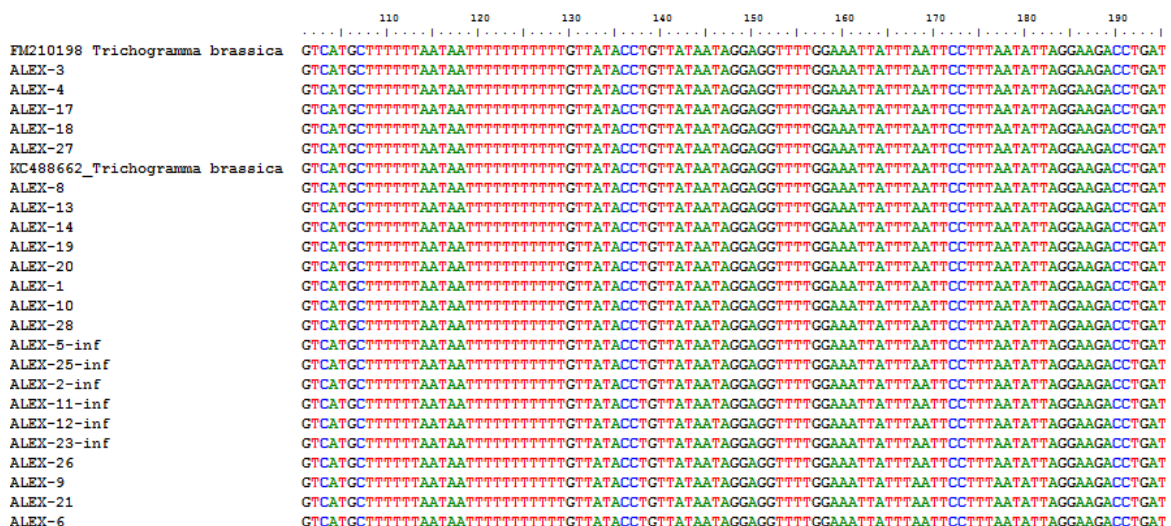
Elektroforezom PCR produkata, dobijenih amplifikacijom COI gena, nisu registrovani amplikoni za uzorke: ALEX-2, ALEX-3, ALEX-4, ALEX-5, ALEX-6, ALEX-7, ALEX-9, ALEX-10, ALEX-12, ALEX-15, ALEX-16, ALEX-17, ALEX-18, ALEX-21, ALEX-22,

ALEX-23, ALEX-24, ALEX-27 i ALEX-28. PCR reakcija za navedene uzorke je ponovljena korišćenjem 5 µl ekstrahovane DNK po uzorku i 20 µl PCR mastermiksa.

Ponovljenom amplifikacijom COI gena mitohondrijalne DNK sa 5 µl izolovane DNK postignuti su značajnije bolji rezultati, odnosno elektroforezom su registrovani ampliconi kod svih testiranih uzoraka osim kod uzoraka ALEX-7, ALEX-15, ALEX-16, ALEX-22 i ALEX-24. Ukupno 23 uzorka kod kojih je amplifikacija COI gena dala pozitivne rezultate, podvrgnuti su sekvenciranju na Institute for Integrative Genome Biology, a utvrđeni redosledi nukleotida COI gena su za svaki uzorak prikazani na slikama 55 do 60).



Slika 55. Redosled nukleotida (0-100) na COI genu uzorkovanih jedinki *Trichogramma* spp. u 2016. godini.



Slika 56. Redosled nukleotida (100-200) na COI genu uzorkovanih jedinki *Trichogramma* spp. u 2016. godini.


```

      510      520      530      540      550      560      570
FM210198 Trichogramma brassica ATTATTGTCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTT
ALEX-3 ATTATTGTCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTA
ALEX-4 ATTATTGTCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAA
ALEX-17 ATTATTGTCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATAC
ALEX-18 ATTATTGTCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTT
ALEX-27 ATTATTGTCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACT
KC488662 Trichogramma brassica ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAAA
ALEX-8 ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTA
ALEX-13 ATTATTATCATTACCAGTTT
ALEX-14 ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACT
ALEX-19
ALEX-20
ALEX-1 ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACT
ALEX-10 ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTT
ALEX-28 ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTT
ALEX-5-inf ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTT
ALEX-25-inf ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACT
ALEX-2-inf ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACT
ALEX-11-inf ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACT
ALEX-12-inf ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTT
ALEX-23-inf ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTA
ALEX-26 ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACT
ALEX-9 ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTT
ALEX-21 ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCG
ALEX-6 ATTATTATCATTACCAGTTT TAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTT

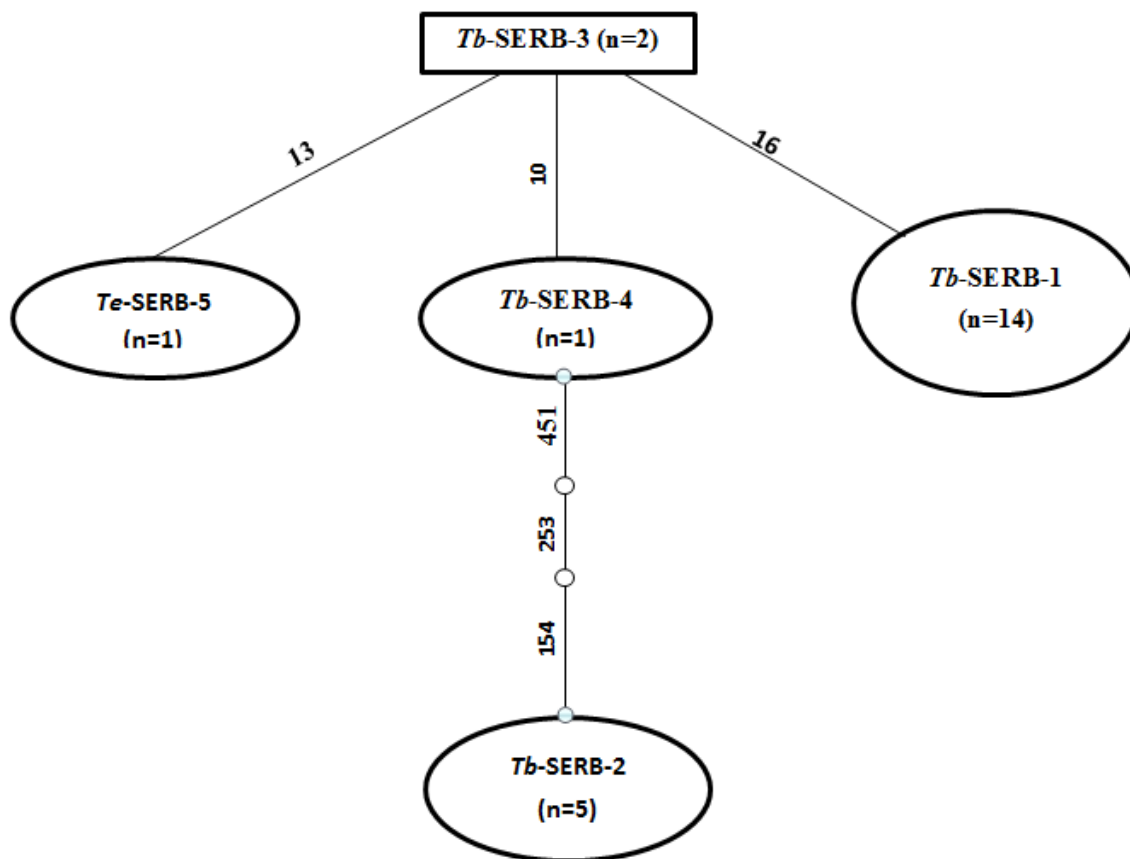
```

Slika 60. Redosled nukleotida (500-580) na COI genu uzorkovanih jedinki *Trichogramma* spp. u 2016. godini.

Poravnavanjem očitanih sekvenci (Prilog 4) pomoću programa BioEdit Sequence Alignment Editor i poređenjem dobijenih rezultata sa sekvencama u Genbanci onlajn (BLAST program), ustanovljeno je prisustvo 5 različitih haplotipova među *Trichogramma* jedinkama uzorkovanim u kikindskom regionu u 2016. godini (Tabela 3, Prilog 4, Slika 61).

Tabela 3. Haplotipovi jedinki *Trichogramma* sp. uzorkovanih u regionu opštine Kikinda u 2016. godini.

Oznaka za haplotip	Vrsta	<i>Trichogramma</i> jedinke sa istim haplotipom
TbSERB-1	<i>T. brassicae</i>	ALEX-8, ALEX-13, ALEX-14, ALEX-19, ALEX-20, ALEX-1, ALEX-10, ALEX-28, ALEX-5, ALEX-25, ALEX-2, ALEX-11, ALEX-12, ALEX-23
TbSERB-2	<i>T. brassicae</i>	ALEX-3, ALEX-4, ALEX-17, ALEX-18, ALEX-27
TbSERB-3	<i>T. brassicae</i>	ALEX-26, ALEX-9
TbSERB-4	<i>T. brassicae</i>	ALEX-21
TeSERB-5	<i>T. evanescens</i>	ALEX-6



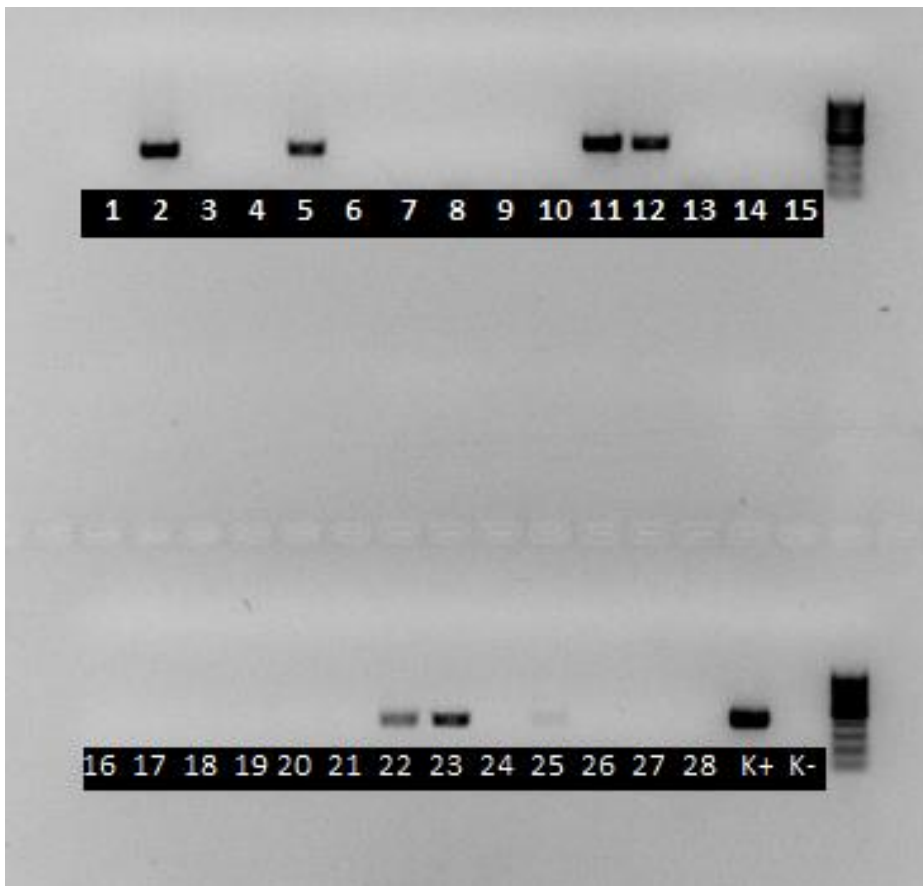
Slika 61. Haplotipska mreža *Trichogramma* jedinki uzorkovanih u Kikindi tokom 2016. godine. Svaka linija koja povezuje polja u haplotipskoj mreži predstavlja pojedinačnu nukleotidnu razliku, dok broj na liniji određuje položaj u sekvenci gde se ta razlika javila (program TCS, version 1.21).

Od pet registrovanih haplotipova, dva haplotipa se ističu kao dominantna (TbSERB-1 i TbSERB-2). Analizom rezultata konstatovano je da 14 ispitivanih jedinki pripada haplotipu TbSERB-1, dok 5 ispitivanih jedinki pripada haplotipu TbSERB-2. Sekvence identifikovane kao TbSERB-1 (sa lokaliteta Kinđa, Stankić, Banatska Topola, Nakovo i Banatsko Veliko Selo) su prema podacima iz GenBank prethodno registrovane u Iranu (pristupni broj KC488662), dok su sekvence identifikovane kao TbSERB-2 (sa lokaliteta: Kinđa, Nakovo and Banatsko Veliko Selo) prethodno registrovane u Švajcarskoj (pristupni broj FM210198) (Slika 49-54). COI sekvenca uzorka ALEX6, identifikovanog na osnovu ITS2 sekvence kao *T. evanescens*, vrlo je slična sa COI sekvencama u ostalim testiranim uzorcima, uz 96% sličnosti sa sekvencom koja je u GenBank priložena kao *T. evanescens* (pristupni broj JX829526).

4.2.3. Prisustvo *Wolbachia* bakterije u *Trichogramma osicama*

Amplifikacija 16S gena pokazala je prisustvo ovog bakterijskog gena u pet testiranih uzoraka sa oznakama ALEX-2 (lokalitet Kinda), ALEX-5, ALEX-11, ALEX-12 (lokalitet Stankić), i ALEX-23 (lokalitet Banatsko Veliko Selo), dok su uzorci ALEX-22 (Nakovo) i ALEX-25 (Banatsko Veliko Selo) bili suspektni (Slika 62). Svi navedeni uzorci pripadaju istom COI haplotipu (TbSERB-1), izuzev u slučaju uzorka ALEX-22, za koji nije mogao biti određen haplotip usled nemogućnosti dobijanja amplikona COI gena.

Međutim, dobijeni amplikoni 16S gena ne potvrđuju da li su uzorkovane *Trichogramma* jedinke inficirane sa *Wolbachia* bakterijom ili je prisustvo bakterijskog DNK posledica ishrane uzorkovanih jedinki na inficiranom domaćinu (*O. nubilalis*).

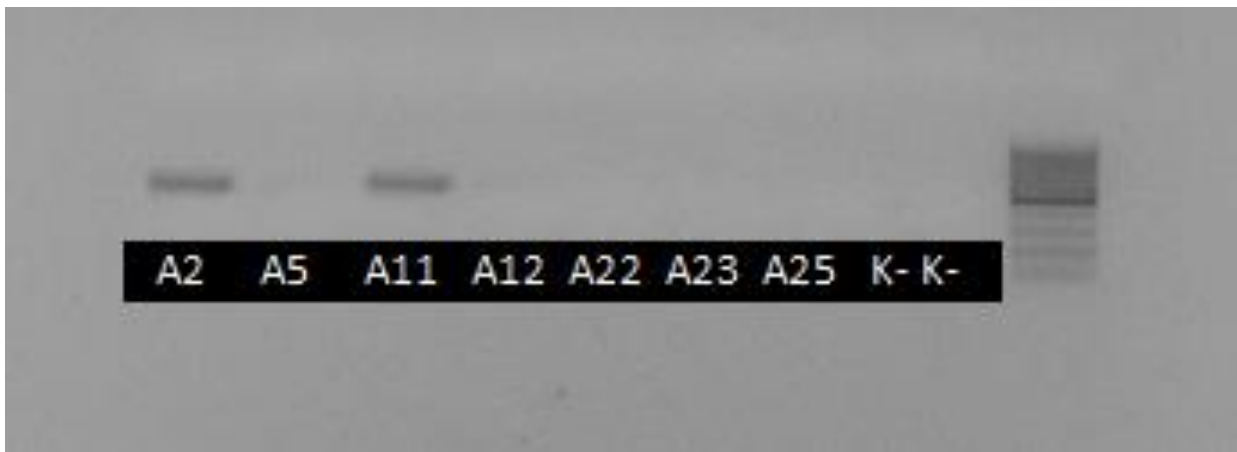


Slika 62. Elektroforegram 16S gena u uzorcima *Trichogramma osica* ALEX 1-28 (K+ pozitivna kontrola, K- negativna kontrola).

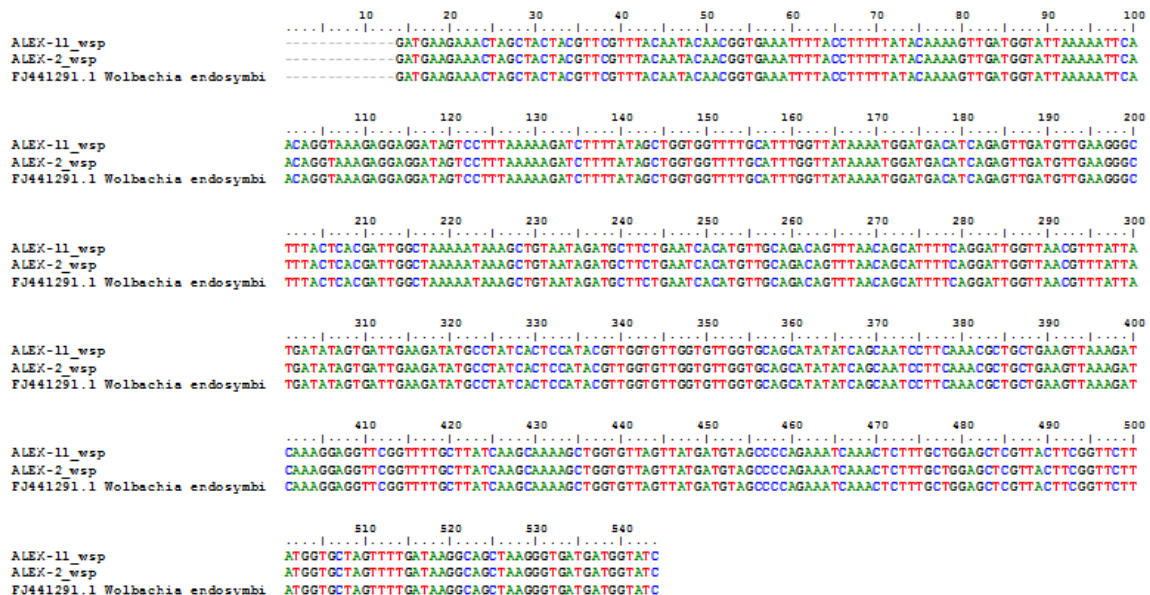
Pošto detekcija 16S gena nije siguran indikator da li je bakterija *Wolbachia* prisutna u genitalnom ili crevnom traktu ispitivanih jedinki, izvršena je amplifikacija *wsp* (*Wolbachia* surface protein gene) bakterijskog gena. S obzirom da 16S gen nije registrovan u svim

testiranim uzorcima, amplifikacija *wsp* gena obavljena je samo sa uzorcima u kojima je prisustvo 16S gena potvrđeno elektroforezom, uključujući i suspektne uzorke.

Amplifikacija *wsp* gena u testiranim uzorcima (ALEX 2, ALEX 5, ALEX 11, ALEX 12, ALEX 22, ALEX 23 i ALEX 25) rezultirala je PCR produktom kod dva uzoraka Alex 2 i Alex 11 (Slika 63). Stoga su amplikoni iz ova dva uzoraka podvrgnuti sekvenciranju radi utvrđivanja redosleda nukletida na *wsp* regionu i poređenju dobijenih rezultata sa podacima u Genbank onlajn (Slika 64).



Slika 63. Elektroforegram *wsp* gena za uzorake ALEX 2, ALEX 5, ALEX 11, ALEX 12, ALEX 22, ALEX 23, ALEX 25.



Slika 64. Rezultati sekvencioniranja *wsp* gena u uzorcima ALEX 2 i ALEX 11 i poređenje sa poznatim *Wolbachia* izolatima u Genbanci.

Dobijene sekvence *wsp* gena, izolovane iz uzoraka ALEX 2 i ALEX 11 identične su sa nekoliko već priloženih sekvenci u GenBanci (pristupni broj FJ441291), koje se odnose na *Wolbachia* bakteriju, specifičnu za *T. brassicae* (Slika 64, Prilog 5). Sa druge strane dobijene *wsp* sekvence iz ALEX 2 i ALEX 11 se značajno razlikuju od postojećih sekvenci u Genbanci koje se odnose na *Wolbachia* bakteriju specifičnu za *O. nubilalis* (pristupni broj GU166588). Ovakav rezultat potvrđuje da prisustvo bakterije u *Trichogramma* uzorcima u ova dva uzorka nije posledica ishrane jedinki na domaćinu infestiranom *Wolbachia* bakterijom, već rezultat prirodnog prisustva ove endosimbiontske bakterije u testiranim jedinkama *T. brassicae*.

4.3. Rezultati morfološke i molekularne identifikacije jedinki uzorkovanih u 2017. godini

U cilju utvrđivanja aktivnosti *Trichogramma* spp., odnosno određivanja stope parazitiranosti jajnih legala kukuruznog plamenca, pregledi useva kukuruza su u 2017. godini obavljani na šest lokaliteta u okviru teritorije opštine Kikinda: Mokrin, Idoš, Bašaid, Nakovo, Banatska Topola i Stankić. Monitoringom ženki druge i treće generacije kukuruznog plamenca, od druge dekade jula do treće dekade septembra meseca, pregledano je ukupno 121 jajno leglo kukuruznog plamenca, a od ukupnog broja pregledanih, registrovano je 47 parazitiranih jajnih legala od strane *Trichogramma* spp., odnosno prosečna stopa parazitiranosti na teritoriji opštine Kikinda iznosila 38,84%. Prosečna stopa parazitiranosti po lokalitetima je iznosila od 15% u Stankiću do 62,50% u Idošu (Tabela 4). Pored značajno niže stope parazitiranosti jajnih legala u odnosu na prethodnu godinu, u 2017. godini u nekoliko slučajeva prilikom pregleda na pojedinim lokalitetima nisu zabeležena parazitirana legla (u Banatskoj Topoli 18. jula i Stankiću 17. i 21. jula). Na ostalim lokalitetima opštine Kikinda, gde su prilikom svakog pregleda zabeležena parazitirana jajna legla, stopa parazitiranosti je u pojedinim danima pregleda ipak bila visoka (iznad 60%): u Mokrinu dana 14. septembra (80%), Idošu 7. avgusta i 15. septembra (100%, odnosno 62,5%), Bašaidu 13. septembra i Nakovu 14. septembra (po 66,67%).

Sakupljanje parazitiranih jajnih legala *O. nubilalis* u cilju odgajivanja i istraživanja osica *Trichogramma*, u 2017. godini je vršeno na ukupno 12 lokaliteta na području Vojvodine, i to na istim lokalitetima na teritoriji opštine Kikinda kao i u 2016. godini, a u listu lokaliteta dodatno je uključeno još šest lokaliteta, od kojih dva u Banatu (Čoka i Senta) i četiri u Bačkoj (Njegoševo, Despotovo, Vrbas i Gakovo). U skladu sa rezultatima monitoringa adulta svetlosnim klopnama, koje je sprovedeno u Kikindi i Banatskoj Topoli u 2017. godini, može

se zaključiti da su jajna legala koja su sakupljena u periodu od treće dekade jula do prve dekade avgusta položena od strane ženki druge generacije *O. nubilalis*, dok su legla sakupljena u toku septembra poreklom od ženki treće generacije kukuruznog plamenca.

Od ukupno 40 parazitiranih jajnih legla sakupljenih sa teritorije Vojvodine u 2017. godini (Tab. 5), za istraživanja su upotrebljene po dve izletele jedinice osica ženskog pola po svakom jajnom leglu, izuzev u slučaju jednog jajnog legla sa lokaliteta Gakovo iz kog se razvila samo jedna ženka osice (jajno leglo pod oznakom JL40, osica označena brojem 40).

Eklodirane jedinice iz uzorkovanih parazitiranih jajnih legala podvrgnute su morfološkoj i molekularnoj identifikaciji. Sve eklodirane jedinice iz uzorkovanih parazitiranih jajnih legala (JL 1-40), determinisane su na osnovu morfoloških karakteristika kao predstavnici roda *Trichogramma* spp.

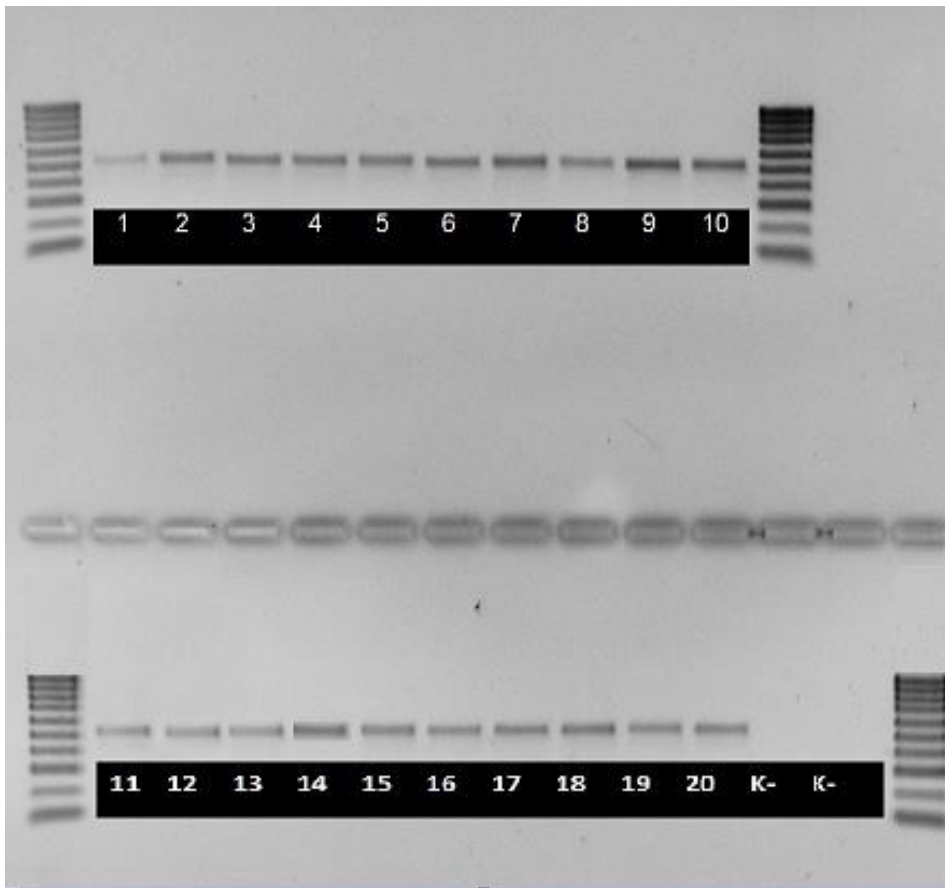
Tabela 4. Parazitiranost jajnih legala *O. nubilalis* na teritoriji opštine Kikinda u 2017. godini.

Lokalitet	Koordinate (geografska širina i dužina)	Datum	Broj jajnih legala <i>O. nubilalis</i>		Stopa parazitiranosti (%)
			Pregledana	Parazitirana	
Mokrin	45°53'0.39"N 20°28'15.41"E	20.7.2017.	13	5	38,46
		28.07.2017.	9	3	33,33
		14.9.2017	5	4	80
		Ukupno	27	12	44,44
Iđoš	45°49'12.38"N 20°22'2.26"E	21.07.2017.	5	2	40
		7.8.2017.	3	3	100
		15.09.2017.	8	5	62,5
		Ukupno	16	10	62,50
Bašaid	46°01'08.66"N 20°05'27.98"E	19.07.2017.	4	1	25,00
		28.07.2017.	8	4	50
		13.9.2017	6	4	66,67
		Ukupno	18	9	50,00
Nakovo	45°51'51.54"N 20°35'18.37"E	04.08.2017.	10	2	20
		10.8.2017.	4	1	25
		14.09.2017.	3	2	66,67
		Ukupno	17	5	29,41
Banatska Topola	45°40'41,71"N 20°29'13.02"E	18.7.2017.	6	0	0,00
		28.07.2017.	9	5	55,55
		10.09.2017.	8	3	37,5
		Ukupno	23	8	34,78
Stankić	45°51'08.11"N 20°25'03.22"E	17.7.2017	2	0	0,00
		21.07.2017.	6	0	0,00
		08.09.2017.	5	1	20
		11.09.2017	7	2	28,57
		Ukupno	20	3	15,00
Ukupno za region Kikinde			121	47	38,84

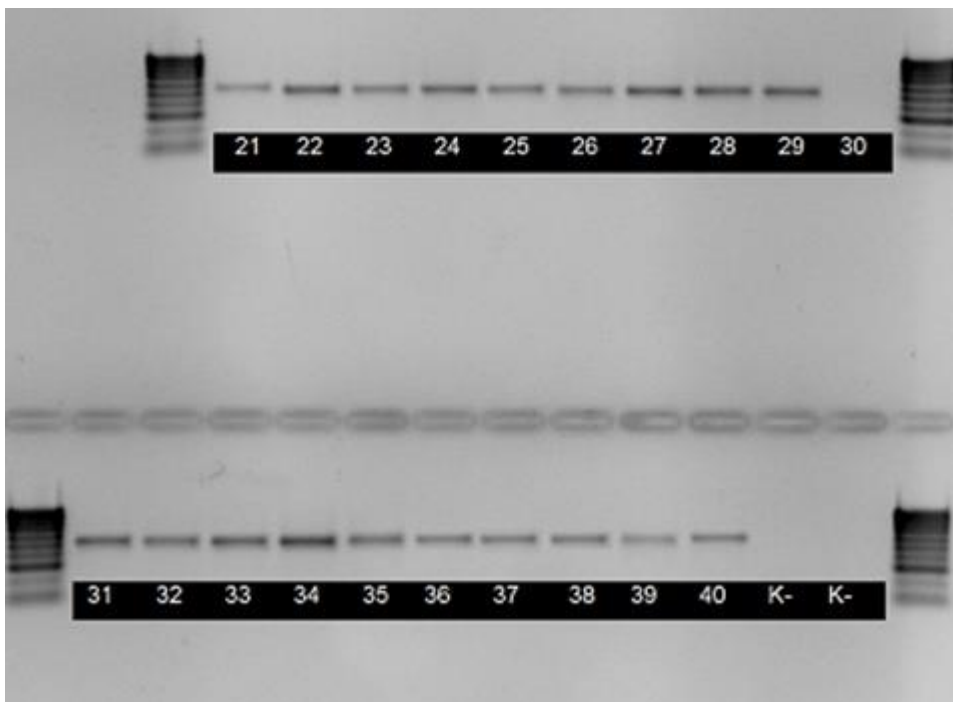
Tabela 5. Podaci o poreklu uzoraka jedinki *Trichogramma* spp. odgajenih iz jajnih legala *O. nubilalis* sakupljenih na teritoriji Vojvodine u 2017 godini i podvrgnutih molekularnoj identifikaciji. Parovi brojeva označavaju testirane jedinice *Trichogramma* osica koje su dobijene iz istog jajnog legla *O. nubilalis*.

Lokalitet	Koordinate (geografska širina i dužina)	Datum	Uzorkovana parazitirana jajna legala <i>O. nubilalis</i>		Oznaka testiranih ženki <i>Trichogramma</i>
			Broj	Akronimi	
Mokrin	45°53'0.39"N 20°28'15.41"E	20.07.2017.	1	JL1	1; 41
		28.07.2017	2	JL2, JL3	2;42; 3; 43
		14.09.2017.	2	JL4, JL5	4; 44; 5; 45
Idoš	45°49'12.38"N 20°22'2.26"E	21.07.2017.	1	JL6	6; 46
		07.08.2017.	1	JL7	7; 47
		15.09.2017.	1	JL8	8; 48
Bašaid	46°01'08.66"N 20°05'27.98"E	28.07.2017.	1	JL9	9; 49
		13.09.2017.	2	JL10, JL11	10; 50; 11; 51
Nakovo	45°51'51.54"N 20°35'18.37"E	04.08.2017.	1	JL12	12; 52
		10.08.2017.	2	JL13, JL14	13; 53; 14; 54
		14.09.2017.	1	JL15	15; 55
Banatska Topola	45°40'41,71"N 20°29'13.02"E	28.07.2017.	1	JL16	16; 56
		10.09.2017.	2	JL17, JL18	17; 57; 18; 58
Stankić	45°51'08.11"N 20°25'03.22"E	08.09.2017.	2	JL19, JL20	19; 59; 20; 60
		11.09.2017	1	JL21	21; 61
Njegoševo	45°47'53.61"N 19°39'19.10"E	20.07.2017	1	JL22	22; 62
		18.07.2017	1	JL23	23; 63
		11.09.2017	1	JL24	24; 64
		15.09.2017.	1	JL25	25; 65
Despotovo	45°27'06.22"N 19°32'15.57"E	29.07.2017	2	JL26, JL27	26; 66; 27; 67
		10.08.2017.	3	JL28, JL29, JL30	28; 68; 29; 69; 30; 70
		17.9.2017.	3	JL31, JL32, JL33	31; 71; 32; 72; 33; 73
Čoka	45°57'27.80"N 20°08'31.25"E	22.09.2017	1	JL34	34; 74
Senta	45°53'53.92"N 20°05'14.01"E	22.09.2017	1	JL35	35; 75
Vrbas	45°35'36.81"N 19°39'4.86"E	11.09.2017	2	JL36, JL37	36; 76; 37; 77
Gakovo	45° 54'41.07"N 19°04'42.11"E	18.09.2017	3	JL38, JL39, JL40	38;78; 39;79; 40; -
Ukupno za Vojvodinu			40	JL1 do JL40	79

Amplifikacijom ITS2 regiona DNK izolovane iz po jedne ženke osice izletele iz svakog uzorkovanog jajnog legla (JL 1-40), korišćenjem univerzalnih ITS2 prajmera za *Trichogramma* spp., dobijeni su PCR produkti za 40 testiranih jedinki označenih brojevima od 1 do 40. U slučaju svih testiranih jedinki rezultati elektroforeze su potvrdili taksonomsku pripadnost osica rodu *Trichogramma* (Slike 65 i 66).



65. Elektroforegram uzoraka *Trichogramma* osica od broja 1 do 20 sa dve negativne kontrole (K-).



Slika 66. Slika 63. Elektroforegram *Trichogramma* osica od broja uzoraka 21 do 40 sa dve negativne kontrole (K-).

Rezultati elektroforeze pokazali su da dužina dobijenih PCR produkata iznosi približno 500 baznih parova, što se podudara sa dužinom ITS2 segmenta rDNK kod vrsta *T. brassicae* i *T. evanescens*.

Na osnovu dobijenih rezultata u sledećem koraku je sprovedena Multiplex PCR metoda, korišćenjem specifičnih reverse prajmera za *T. evanescens* i *T. brassicae* i DNK izolovane iz 79 uzorkovanih jedinki. Multiplex PCR metoda rezultirala je sa 79 PCR produkata. Elektroforeza dobijenih amplikona (Slike 67 do 71) pokazala je da se 77 amplikona sastoji od približno 200 baznih parova, što odgovara vrsti *T. brassicae*. Dužina preostala dva amplikona iznosila je približno 500 baznih parova, što odgovara vrsti *T. evanescens* (Tabela 6).

Jedinka označena brojem 14 izolovana iz parazitiranog jajnog legla uzorkovanog u Nakovu 10.08.2017 (JL14), i jedinka označena sa brojem 41 izolovana iz parazitiranog jajnog legla uzorkovanog u Mokrinu 20.07.2017 (JL1), identifikovane su kao *T. evanescens* (Slike 67 i 69), dok su sve ostale testirane jedinice identifikovane kao *T. brassicae* (Tabela 6, Slike 67 do 71). U oba slučaja nalaza *T. evanescens*, druga jedinka koja se razvila iz istog jajnog je identifikovana kao *T. brassicae*.

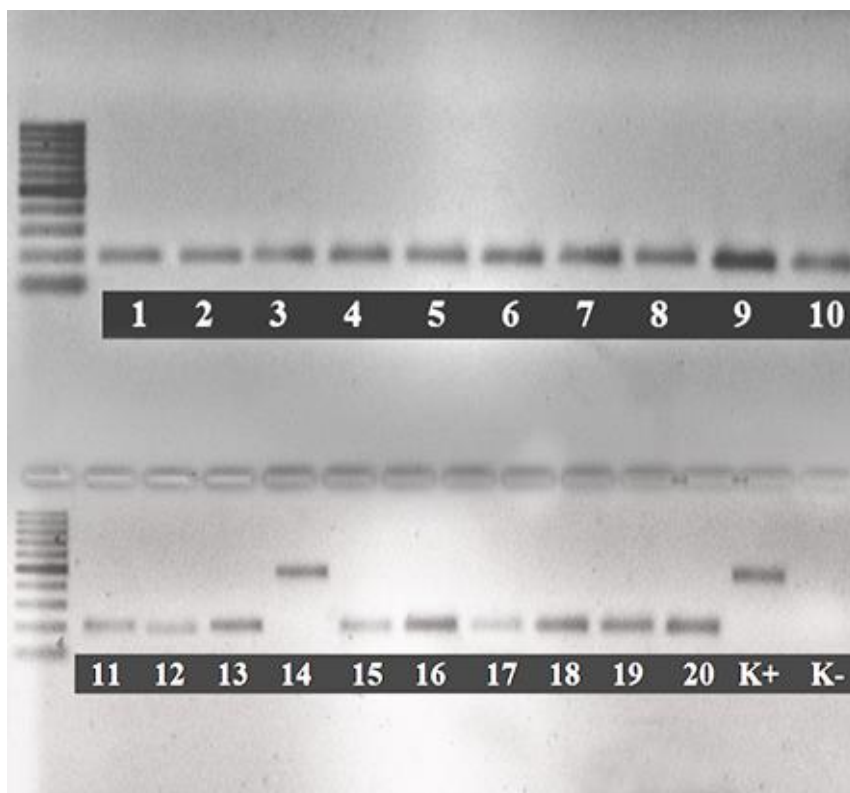
Dakle, na osnovu dobijenih rezultata identifikacije uzoraka primenom Multiplex PCR metode, može se zaključiti da na području Vojvodine dominira vrsta *T. brassicae* koja je identifikovana u 97,47% uzoraka i u većini istraživanih lokaliteta u Vojvodini je predstavljala jedinu vrstu koja parazitira jaja *O. nubilalis*. Vrsta *T. evanescens* je, kao i u toku 2016. godine, identifikovana na području opštine Kikinda i tokom 2017. godine. U obe godine istraživanja *T. evanescens* je predstavljala retku vrstu, ali je ipak detektovana u tri lokaliteta: u Stankiću (u 2016. godini), Mokrinu i Nakovu (u 2017. godini) i to u sva tri slučaja se razvila iz jaja kukuruznog plamenca koja su položila ženke druge generacije.

Pošto je iz parazitiranog jajnog legla označenog sa JL14, jedna jedinka identifikovana kao *T. evanescens* (14), a druga testirana jedinka kao *T. brassicae* (54), sve ostale jedinice eklodirane iz parazitiranog jajnog legla JL14, kojih je bilo još pet, podvrgnute su DNK ekstrakciji, a zatim Multiplex PCR metodi (Slika 72), pri čemu je kao pozitivna kontrola upotrebljena je DNK *T. evanescens*.

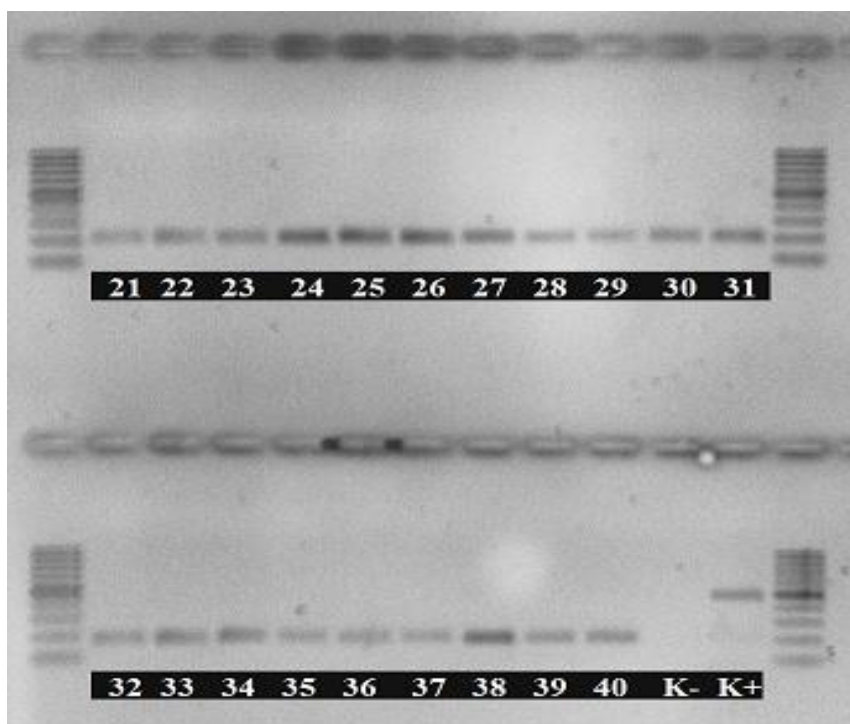
Iz jajnog legla JL1 razvile su se svega dve *Trichogramma* jedinice, determinisane kao *T. brassicae* i *T. evanescens*, te stoga Multiplex PCR metoda za uzorak JL1 nije mogla biti ponovljena.

Tabela 6. Rezultati molekularne identifikacije uzorkovanih jedinki roda *Trichogramma* teritoriji Vojvodine u 2017. godini.

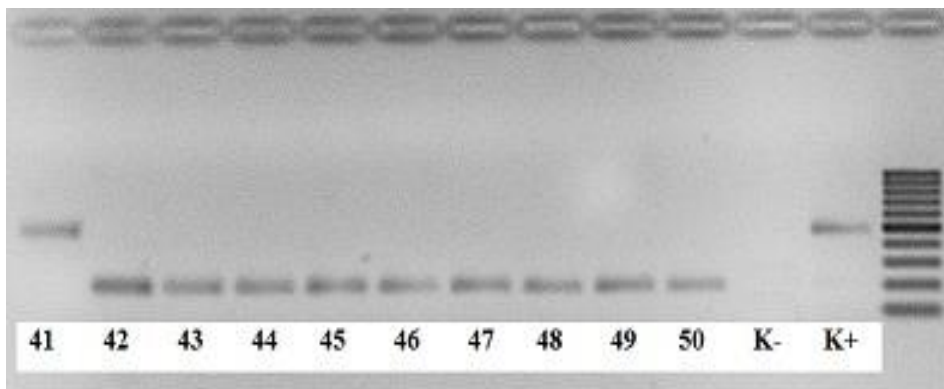
Lokalitet	Oznaka jajnog legla <i>O. nubilalis</i>	Broj testiranih jedinki osica po uzorku	Identifikovana vrsta	Oznake testiranih jedinki <i>Trichogramma</i>
Mokrin	JL1	2	<i>T.brassicae</i>	1
			<i>T. evanescens</i>	41
	JL2	2	<i>T.brassicae</i>	2; 42
	JL3	2	<i>T.brassicae</i>	3; 43
	JL4	2	<i>T.brassicae</i>	4; 44
Iđoš	JL5	2	<i>T.brassicae</i>	5; 45
	JL6	2	<i>T.brassicae</i>	6; 46
	JL7	2	<i>T.brassicae</i>	7; 47
Bašaid	JL8	2	<i>T.brassicae</i>	8; 48
	JL9	2	<i>T.brassicae</i>	9; 49
	JL10	2	<i>T.brassicae</i>	10; 50
Nakovo	JL11	2	<i>T.brassicae</i>	11; 51
	JL12	2	<i>T.brassicae</i>	12; 52
			<i>T. evanescens</i>	14
	JL13	2	<i>T.brassicae</i>	13; 53
JL14	2	<i>T.brassicae</i>	54	
Banatska Topola	JL15	2	<i>T.brassicae</i>	15; 55
	JL16	2	<i>T.brassicae</i>	16; 56
	JL17	2	<i>T.brassicae</i>	17; 57
Stankić	JL18	2	<i>T.brassicae</i>	18; 58
	JL19	2	<i>T.brassicae</i>	19; 59
	JL20	2	<i>T.brassicae</i>	20; 60
Njegoševo	JL21	2	<i>T.brassicae</i>	21; 61
	JL22	2	<i>T.brassicae</i>	22; 62
	JL23	2	<i>T.brassicae</i>	23; 63
	JL24	2	<i>T.brassicae</i>	24; 64
Despotovo	JL25	2	<i>T.brassicae</i>	25; 65
	JL26	2	<i>T.brassicae</i>	26; 66
	JL27	2	<i>T.brassicae</i>	27; 67
	JL28	2	<i>T.brassicae</i>	28; 68
	JL29	2	<i>T.brassicae</i>	29; 69
	JL30	2	<i>T.brassicae</i>	30; 70
	JL31	2	<i>T.brassicae</i>	31; 71
JL32	2	<i>T.brassicae</i>	32; 72	
Čoka	JL33	2	<i>T.brassicae</i>	33; 73
Senta	JL34	2	<i>T.brassicae</i>	34; 74
Vrbas	JL35	2	<i>T.brassicae</i>	35; 75
	JL36	2	<i>T.brassicae</i>	36; 76
Gakovo	JL37	2	<i>T.brassicae</i>	37; 77
	JL38	2	<i>T.brassicae</i>	38; 78
	JL39	2	<i>T.brassicae</i>	39; 79
	JL40	1	<i>T.brassicae</i>	40



Slika 67. Elektroforegram uzoraka označenih brojevima od 1 do 20 sa *T. evanescens* kao pozitivnom kontrolom (K+). Uzorak 14 odgovara vrsti *T. evanescens*, svi ostali odgovaraju *T. brassicae*.



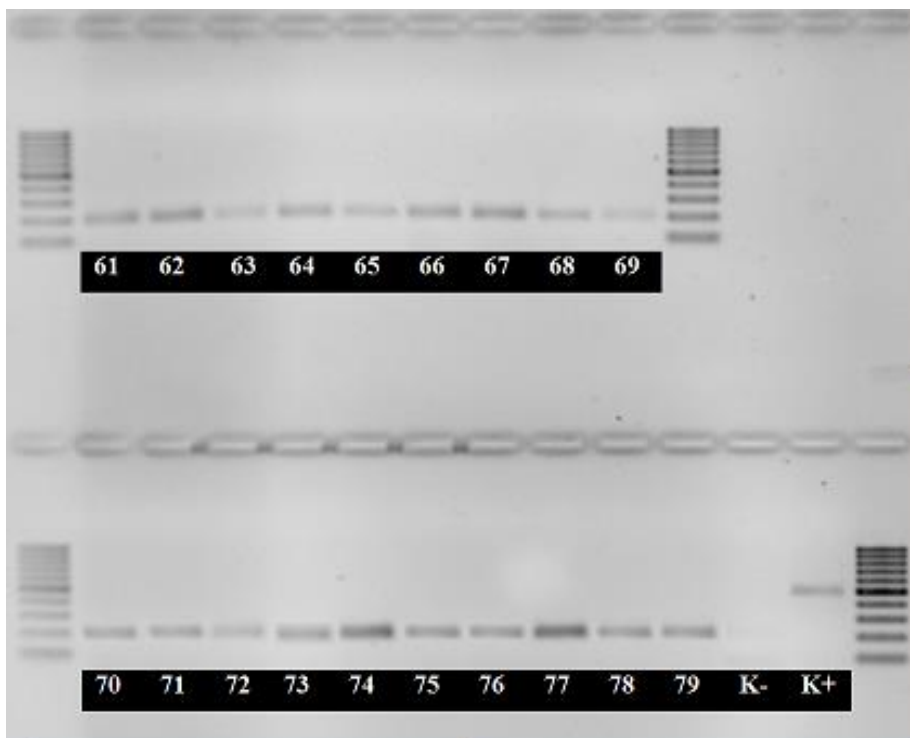
Slika 68. Elektroforegram uzoraka označenih brojevima od 21 do 40 sa *T. evanescens* kao pozitivnom kontrolom (K+). Svi uzorci odgovaraju vrsti *T. brassicae*.



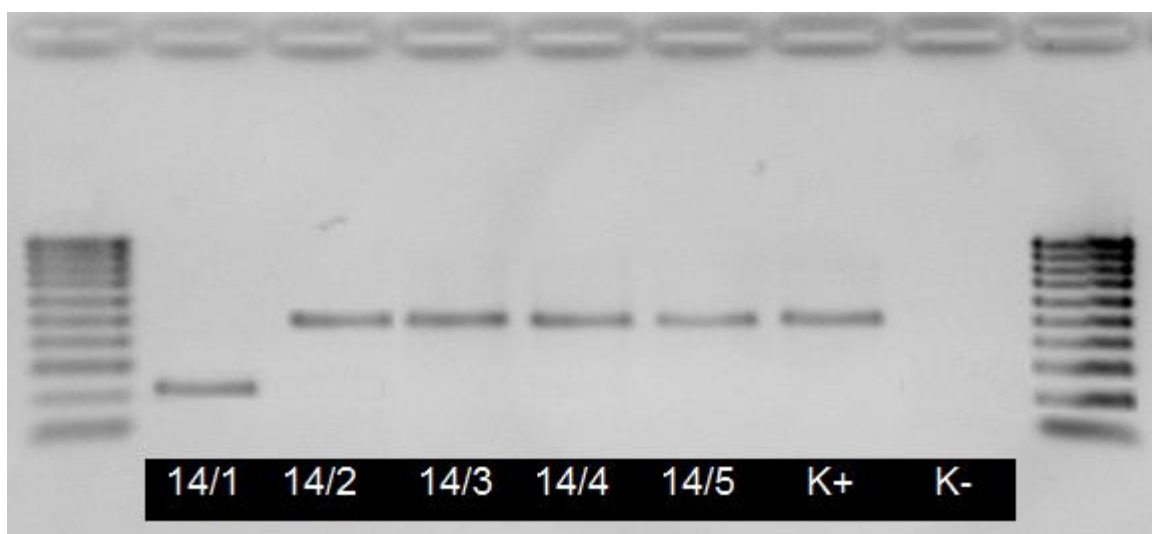
Slika 69. Elektroforegram uzoraka označenih brojevima od 41 do 50 sa *T. evanescens* kao pozitivnom kontrolom (K+). Uzorak 41 odgovara vrsti *T. evanescens*, svi ostali *T. brassicae*.



Slika 70. Elektroforegram uzoraka označenih brojevima od 51 do 60 sa *T. evanescens* kao pozitivnom kontrolom (K+). Svi uzorci odgovaraju vrsti *T. brassicae*.



Slika 71. Elektroforegram uzoraka označenih brojevima od 61 do 79 sa *T. evanescens* kao pozitivnom kontrolom (K+). Svi uzorci odgovaraju vrsti *T. brassicae*.



Slika 72. Elektroforegram jedinki *Trichogramma* eklodiranih iz jajnog legla sa oznakom JL14 sa *T. evanescens* kao pozitivnom kontrolom (K+). Uzorak 14/1 odgovara *T. brassicae*, svi ostali odgovaraju *T. evanescens*.

Rezultati Multipleks PCR metode i elektroforeze pokazali su da od ukupno 7 uzorkovanih *Trichogramma* jedinki iz parazitiranog jajnog legla kukuruznog plamenca JP14, 5 jedinki pripadaju vrsti *T. evanescens* (14, 14/2, 14/3, 14/4, 14/5) odnosno dve jedinke pripadaju vrsti *T. brassicae* (54,14/1).

5. DISKUSIJA

Upotreba parazitoida iz roda *Trichogramma* u biološkom suzbijanju poljoprivrednih štetočina ima široku primenu u mnogim razvijenim zemljama sveta, kao što su Švajcarska, Francuska, Rusija, Nemačka, SAD (Beglyarov i Smitnik, 1977; Hassan, 1993; Bigler, 1986; Van Schelt i Ravensberg, 1991). Ipak, u određenim geografskim regionima, uključujući zemlje Balkana, potencijal ovih insekata u biološkoj borbi nije u potpunosti iskorišćen. Srpska poljoprivreda za sada ne koristi potencijal ovih parazitoida i pored visokog potencijala nativnih populacija (Krnjajić, 2002; Tancik, 2017; Ivezić i sar., 2018). U prilog tome idu rezultati sprovedenog istraživanja, jer je dvogodišnjim monitoringom kukuruznog plamenca na teritoriji Vojvodine registrovano prisustvo parazitiranih jaja ove štetočine uz visoku stopu parazitiranosti od strane osica iz roda *Trichogramma*. Na teritoriji opštine Kikinda u 2016. godini prosečna stopa parazitiranosti iznosila je 64,67%, a u 2017. godini, u kojoj je ukupna brojnost sakupljenih jedinki adulta u klopama tokom sezone višestruko bila niža u odnosu na prethodnu godinu (4,9 puta u Kikindi i 12,2 puta u Topoli), prosečna stopa parazitiranosti jajnih legala je iznosila 38,84%. Ovakvi rezultati istraživanja, koji su pokazali visoki kapacitet parazitizma autohtonih vrsta iz lokalnih populacija *Trichogramma* u prirodnim uslovima istraživanog područja Vojvodine, naročito kada je u pitanju vrsta *T. brassicae*, ukazuju na potencijalnu mogućnost komercijalne proizvodnje i ciljane primene u biološkoj borbi protiv kukuruznog plamenca. Razlike u brojnosti populacija kukuruznog plamenca i *Trichogramma* osica tokom 2016. i 2017. godine, verovatno je uzrokovana uticajem klimatskih faktora u periodu monitoringa. Niže temperature i znatno veće količine padavina tokom jula i avgusta meseca u 2017. godini mogli su negativno uticati na aktivnost II generacije plamenca, a s obzirom na visoku preferentnost *Trichogramma* parazitoida u odnosu na domaćina, i na brojnost populacija parazitoida, odnosno stopu parazitiranosti jajnih legala. U prilog uticaja klimatskih faktora na kukuruznog plamenca zabeleženi su rezultati na teritoriji istočne Hrvatske, gde je tokom 2012. godine registrovano 100% oštećenih biljaka kukuruza u sušnoj godini, dok je u prethodnoj godini koja se odlikovala sa znatno većim količinama padavina i nižim temperaturama prisustvo plamenca registrovano na manje od 50% pregledanih biljaka (Sarajlić i sar., 2017). S druge strane, kada su u pitanju rezultati ovog istraživanja, na osnovu rezultata monitoringa adulta u regionu Kikinde, zapaženo je da bez obzira na razlike u brojnosti populacije kukuruznog plamenca u 2016. i 2017. godini, periodi leta adulta pojedinih generacija, kao i periodi najviše brojnosti su se u

obe godine poklapali, što pokazuje sličnu dinamiku populacija u toku ove dve godine. Iako cilj monitoringa kukuruznog plamenca sprovedenog u ovom radu nije bio posvećen proučavanju uticaja klimatskih faktora na ovu štetočinu, već obezbeđivanje informacija o aktivnosti adulta u cilju iznalaženja parazitiranih jajnih legala, dobijeni rezultati upućuju na potrebe izučavanja uticaja klimatskih promena na ovu štetočinu.

Ključ uspeha komercijalne primene osica u biološkoj borbi leži u izboru odgovarajuće vrste, kako bi se osiguralo da prirodni uslovi sredine odgovaraju biološkim parametrima izabrane vrste (Van Driesche and Bellows, 1996). Introdukovanje neadekvatne vrste u prostor delovanja određene *Trichogramma* vrste koja čini nativnu populaciju ciljnog područja, može uzrokovati dugoročnu supresiju nativnih, ali i introdukovanih vrsta (Fahriye i sar. 2009). Biološki parametri parazitoida kao što su dugovečnost adulta, fekunditet, odnos polova u potomstvu, razvojni ciklus, izbor domaćina i prilagođavanje uslovima životne sredine mogu poslužiti kao kriterijumi pri izboru odgovarajuće vrste. Svi navedeni parametri utiču na efikasnost primenjenih *Trichogramma* osica, jer određuju u kom stepenu će korisni insekt parazitirati ciljnog domaćina, tj. štetnog insekta (Oliveira i sar., 2003). Efikasnost biološke borbe je u direktnoj korelaciji sa kvalitetom prirodnih neprijatelja. S obzirom da se *Trichogramma* vrste za komercijalne potrebe uzgajaju laboratorijskim putem, neophodno je ispitati sve faktore, kako biotičke tako i abiotičke, koji utiču na kvalitet proizvedenih osica i biološke karakteristike primenjenih parazitoida (Colinet i Boivin, 2011). Ipak, osnovni preduslov za uspostavljanje masovnog gajenja i komercijalnu primenu ovih korisnih insekta je tačna identifikacija vrsta iz prirodnih populacija parazitoida. Pouzdana identifikacija prisutnih vrsta *Trichogramma* na teritoriji Srbije u velikoj meri olakšava izbor najadekvatnije *Trichogramma* vrste za laboratorijsku produkciju i terensku aplikaciju. Pored navedenog, pogrešna identifikacija može uzrokovati laboratorijsko gajenje neadekvatnih *Trichogramma* vrsta i njihovu distribuciju. Na teritoriji Severne Amerike pojedine *Trichogramma* vrste su pogrešno identifikovane i kao takve su distribuirane u komercijalne svrhe, aslični problemi javljali su se sredinom devedesetih i na evropskom tlu prilikomsuzbijanja kukuruznog plamenca (Fahriye i sar., 2009).

Tokom ovog istraživanja, molekularna identifikacija *Trichogramma* jedinki uzorkovanih tokom 2016. i 2017. godine sprovedena je na osnovu redosleda nukleotida na ITS2 segmentu rDNK, pri čemu je utvrđeno da je dominantna vrsta na teritoriji Vojvodine *T. brassicae*. Ova *Trichogramma* vrsta se uspešno koristi u mnogim evropskim zemljama za kontrolu kukuruznog plamenca, ali i drugih štetočina u poljoprivredi (Suverkropp i sar., 2001). Upotrebljene molekularne tehnike predstavljaju relativno jednostavan način za potvrdu

identifikacije jedinki namenjenih za komercijalnu upotrebu. Prema Stouthameru i sar. (1999) ITS2 segment ribozomske DNK se vrlo uspešno primenjuje za identifikaciju različitih *Trichogramma* vrsta, jer je razlika u redosledu baznih parova na ovom rDNK regionu veoma mala unutar iste *Trichogramma* vrste, dok je sa druge strane razlika u sekvencama nukleotida na ITS2 regionu kod različitih vrsta veoma izražena. Sve *Trichogramma* vrste kod kojih su evidentne razlike u određenim morfološkim karakteristikama razlikuju se i po redosledu baza na ITS2 segmentu (Stouthamer i sar., 2010). Otkriće praktičnog značaja ITS2 regiona uslovalo je sistematsko proučavanje intraspecijske varijacije ITS2 regiona, što je rezultiralo razvojem dijagnostičkih molekularnih ključeva za identifikaciju *Trichogramma* vrsta specifičnih za određene regione (Silva i sar., 1999a; Ciociola i sar., 2001a; Thomson i sar., 2003) i useve (Nagarkatti i Nagaraja, 1971; Pinto i Stouthamer, 1994; Pinto i sar., 2002), odnosno razvojem metoda za razlikovanje srodnih *Trichogramma* vrsta (Stouthamer i sar., 1999; Borghuis i sar., 2004; Chang i sar., 2001; Ciociola i sar., 2001b; Dang i sar., 2005; Sappal i sar., 1995; Stouthamer i sar., 2000a, Stouthamer i sar., 2000b).

Sprovedeno istraživanje pokazalo je da primena ITS2 segmenta predstavlja pouzdan metod za razlikovanje srodnih *Trichogramma* vrsta prisutnih na teritoriji Srbije kao što su *T. brassicae* i *T. evanescens*, koje su po morfološkim karakteristikama vrlo slične, ali se razlikuju po redosledu nukleotida na ITS2 regionu. Sekvenciranjem ITS2 regiona rDNK određena je interspecijska varijacija između identifikovanih *Trichogramma* vrsta na teritoriji Vojvodine i definisana je razlika u redosledu baza na ITS2 segmentu rDNK. Značajna prednost molekularne metode jeste mogućnost identifikacije *Trichogramma* ženki, što je vrlo teško postići analizom morfoloških karakteristika (Nasari i sar., 2013).

Slične rezultate, amplifikacijom ITS2 regiona rDNK, postigli su Almeida (2004) i Ciociola i sar. (2001a) prilikom identifikacije *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988, *Trichogramma exiguum* Pinto i Platner, 1978 i *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879. Na isti način su Davies i sar. (2006) ustanovili razliku između *T. pretiosum* i *Trichogramma australicum* Girault, 1912. Sekvenciranje ITS2 regiona rDNK predstavlja relativno jednostavnu proceduru, kojom se efikasno kontroliše kvalitet parazitoida gajenih u laboratoriji. Molekularnom identifikacijom smanjuje se mogućnost kontaminacije i mešanja različitih *Trichogramma* vrsta u laboratorijskim uslovima, što je naročito značajno pri masovnom gajenju i evaluaciji efikasnosti apliciranih parazitoida (Silva i sar., 1999a).

Interspecijska razlika između *T. brassicae* i *T. evanescens* u redosledu nukleotida na ITS2 segmentu rDNK omogućila je dizajniranje specifičnih reverse prajmera za ove dve *Trichogramma* vrste. Specifični prajmeri za *T. brassicae* i *T. evanescens* dizajnirani tokom

ovog istraživanja omogućavaju primenu Multiplex PCR metode, čineći proces molekularne identifikacije uzorkovanih jedinki značajno bržim i finansijski manje zahtevnim. Multiplex PCR ne zahteva sekvenciranje amplicona što predstavlja finansijski i vremenski najzahtevniji segment molekularne identifikacije. U ovom radu testirana je primenljivost multipleks lančane reakcije polimeraze za identifikaciju jedinki uzorkovanih u 2016. i 2017. godini, pri čemu se primenjena metoda pokazala kao jednostavna, brza i pouzdana metoda za identifikaciju *T. brassicae* i *T. evanescens*. Ipak, da bi se molekularna identifikacija *T. brassicae* i *T. evanescens*, bazirana na Multipleks PCR metodi, mogla praktično primeniti neophodno je prethodno sekvencirati ITS2 segment rDNK i utvrditi redosled nukleotida kod obe *Trichogramma* vrste. U Portugalu i Španiji, razvijen je i primenjen sličan metod molekularne identifikacije za razlikovanje pet nativnih *Trichogramma* vrsta (Silva i sar., 1999a; Del-Pino i sar., 2013), dok se u Meksiku po istom principu vrši identifikacija *Trichogramma* vrsta koje pronalaze primenu u biološkoj kontroli poljoprivrednih štetočina (España-Luna i sar., 2008).

S obzirom da samo *Trichogramma* ženke imaju sposobnost parazitiranja jaja štetnih insekata, odnos polova u potomstvu je od ključne važnosti u procesima laboratorijske produkcije parazitoida (de Almeida, 2004). Telitokna partenogeneza indukovana *Wolbachia* bakterijom obezbeđuje odgovarajuću prednost u komercijalnoj proizvodnji parazitoida, jer ovakve linije obezbeđuju veću proporciju ženskog potomstva (Nazeri i sar., 2015). Ipak, pojedine studije ističu da *Wolbachia* može uticati negativno na pojedine biološke osobine parazitoida. Prema navodima Nazeri i sar. (2015), *Wolbachia* bakterija ne povećava stopu parazitizma *T. brassicae* na jajima brašnenog moljca *Ephesia kuehniella* Zeller, 1879, dok je ustanovljeno da prisustvo bakterije negativno utiče na fekunditet zaraženih ženki.

Redukcija fekunditeta zaraženih ženki zabeležena je i kod drugih *Trichogramma* vrsta, što pokazuju određena istraživanja sprovedena u laboratorijskim i poljskim uslovima (Stouthamer i Luck, 1993; Wang i Smith, 1996; Silva i sar., 1999b; Hohmann i sar., 2001). Ukoliko se uticaj bakterije posmatra na nivou pojedinačne jedinice, *Wolbachia* negativno utiče na efikasnost primenjenih parazitoida u biološkoj kontroli smanjujući fekunditet i stopu parazitizma. Međutim, sa aspekta određene *Trichogramma* populacije, smanjen fekunditet pojedinačne jedinice nadoknađuje se značajno većim udelom potomstva ženskog pola kod ženki zaraženih sa *Wolbachia* bakterijom. Stoga telitokna partenogeneza indukovana ovom endosimbiontskom bakterijom ipak pronalazi praktičan značaj u procesima biološke kontrole.

Među uzorkovanim jedinkama u 2016. godini, određen je relativno nizak procenat zaraženosti testiranih uzoraka sa *Wolbachia* bakterijom. Od pet registrovanih haplotipova, prisustvo bakterije je detekcijom 16S gena potvrđeno samo kod predstavnika haplotipa

TbSERB-1, dok je unutar ovog haplotipa, bakterija registrovana kod 35,71% ispitivanih jedinki. Prisustvo zaraženih i nezaraženih jedinki unutar iste populacije je vrlo česta pojava kod vrsta iz roda *Trichogramma* (Huigens i Stouthamer, 2003).

Sekvenciranjem izolovanog *wsp* gena utvrđena je velika sličnost identifikovanog soja *Wolbachia* bakterije sa sojem koji indukuje partenogenezu kod *T. pretiosum* (pristupni broj JX131628.1). *Wsp* gen kodira sintezu površinskih proteina kod *Wolbachia* bakterije i veoma uspešno se primenjuje za identifikaciju različitih bakterijskih sojeva. Takođe, na osnovu sekvenci *wsp* gena izvršeno je klasifikovanje različitih sojeva *Wolbachia* bakterije u 2 supergrupe (A i B) i 12 različitih grupa, pri čemu 8 grupa pripada supergrupi A, dok 4 grupe pripadaju supergrupi B (Zhou i sar., 1998). *Wolbachia* kod domaćina izaziva različite anomalije kao što su: citoplazmatična inkompatibilnost (Breeuwer, 1997; Hoffmann i Truelli, 1997), feminizacija mužjaka (Bouchon i sar., 1998; Kageyama i sar., 1998), povećanje mortaliteta mužjaka (Hurst i sar., 1999) i partenogeneza (Stouthamer, 1997; Arakaki i sar., 2001). Stoga, za potrebe laboratorijske produkcije i komercijalne primene, neophodno je sprovesti detaljnija istraživanja i definisati uticaj *Wolbachia* bakterija na reprodukciju *Trichogramma* populacije u Srbiji.

U 2016. godini je korišćenjem COI gena određena genetička varijabilnost uzorkovanih *Trichogramma* jedinki na teritoriji Kikinde i dobijene su informacije o biodiverzitetu vrsta iz roda *Trichogramma* području bez prethodnog komercijalnog introdukovanja ovih insekata. Među testiranim jedinkama utvrđena su 4 različita haplotipa *T. brassicae*, pri čemu više od polovine jedinki pripada istom haplotipu (TbSERB-1). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da haplotip TbSERB-1 pokazuje visoku stopu parazitizma u prirodnim uslovima, te se stoga može izdvojiti kao adekvatan kandidat za upotrebu u biološkoj kontroli. Za uspešnu komercijalnu primenu već postojećih *Trichogramma* vrsta na teritoriji Srbije, neophodno je sprovesti detaljnija istraživanja radi određivanja potencijalne razlike u terenskim performansama (sposobnost pronalaska domaćina, kapacitet disperzije, stopa parazitizma) različitih haplotipova *T. brassicae*. Ovo je naročito značajno za *Trichogramma* populacije koje su zaražena *Wolbachia* bakterijom, s obzirom da ova endosimbiontska bakterija indukuje partenogenezu kod pojedinih *Trichogramma* vrsta čineći ih pogodnijim agensima u procesima biološke kontrole poljoprivrednih štetočina.

Kompletna inventarizacija biološke raznolikosti *Trichogramma* parazitoidana teritoriji Srbije zahteva identifikaciju prisutnih vrsta i u ostalim regionima u Srbiji. Relativno mali broj detektovanih vrsta može se objasniti činjenicom da je sprovedeno istraživanje izvršeno uzorkovanjem parazitiranih jaja samo jedne poljoprivredne štetočine (kukuruznog plamenca).

U cilju utvrđivanja biodiverziteta ovih parazitskih osica, kao i potencijala u efikasnoj biološkoj borbi, neophodno je ispitati prisustvo *Trichogramma* vrsta i na drugim alternativnim domaćinima, kako na štetnim vrstama, tako i na vrstama koje se ne svrstavaju u kategoriju štetnih organizama, ali su atraktivni domaćini za parazitoide iz roda *Trichogramma*.

S obzirom na biološku raznovrsnost roda *Trichogramma*, istraživanja genetičkog diverziteta populacija *Trichogramma* na širem području Srbije i zemalja u okruženju bi verovatno rezultovalo utvrđivanjem većeg broja autohtonih vrsta *Trichogramma*, koje bi usled prilagođenosti ekološkim uslovima našeg podneblja, mogle biti efikasnije u biološkoj borbi od vrsta i formi poreklom iz drugih delova sveta, a koje se komercijalno gaje i čija primena ne donosi uvek očekivane rezultate u borbi protiv štetnih insekata u poljoprivredi.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata sprovednog istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

- Rezultati dvogodišnjeg monitoringa kukuruznog plamenca, koji u stadijumu jajeta predstavlja domaćina parazitskih osica roda *Trichogramma*, pokazali su da ova značajna štetočina kukuruza produkuje 3 generacije adulta u toku sezone, od kojih je druga generacija najbrojnija.

- Iako se u toku 2016. i 2017. godine brojnost populacije plamenca, praćena svetlosnim klopka na dva lokaliteta, značajno razlikovala (4,4 puta veća ukupna brojnost uhvaćenih jedinki u Kikindi, odnosno 12,2 puta veća brojnost u Banatskoj Topoli u 2016. u odnosu na 2017. godinu), na praćenim lokalitetima zabeležena je pojava osica *Trichogramma* u obe godine istraživanja.

- Praćenjem ovipozicije ženki kukuruznog plamenca registrovan je značajan procenat parazitiranih jajnih legala plamenca u obe godine istraživanja. Prosečna stopa parazitiranosti jajnih legala na praćenim lokalitetima je u 2016. godini iznosila 64,67%, dok je u 2017. godini ona iznosila 38,84%.

- U 2017. godini na oba praćena lokaliteta na teritoriji opštine Kikinda zabeležena je znatno manja brojnost kukuruznog plamenca na svetlosnim klopka, ali i niža stopa parazitizma, što ukazuje na visoku prilagođenost i preferentnost *Trichogramma* spp. u odnosu na kukuruznog plamenca kao domaćina.

- U 2016. godini, amplifikacijom i sekvenciranjem ITS2 regiona rDNK izvršena je molekularna identifikacija jedinki uzorkovanih na 5 različitih lokaliteta na teritoriji opštine Kikinda. Od ukupnog broja testiranih jedinki, 96,15% jedinki je identifikovano kao *T. brassicae*, pri čemu je ova vrsta registrovana na svim praćenim lokalitetima (Kinđa, Stankić, Banatska Topola, Nakovo i Banatsko Veliko Selo). Sa druge strane, *T. evanescens* je identifikovana u samo jednom uzorkovanom parazitiranom jajnom leglu plamenca na lokalitetu Stankić. U toku 2016. godine *T. brassicae* se pokazala kao dominantna vrsta koja parazitira jaja kukuruznog plamenca.

- Analizom rezultata sekvencioniranja zapažena je određena razlika u redosledu baznih parova na ITS2 regionu kod vrsta *T. brassicae* i *T. evanescens* (Slika 50). Na osnovu utvrdjene razlike u sekvencama nukleotida na ITS2 regionu dizajnirani su specifični prajmeri

za *T. brassicae* i *T. evanescens*. Dizajniranjem specifičnih prajmera za *T. brassicae* i *T. evanescens* omogućena je primena Multiplex PCR metode, koja smanjuje kompleksnost molekularne identifikacije *Trichogramma* parazitoida, jer ne zahteva sekvenciranje dobijenih amplikona za determinisanje ove dve vrste.

- Određivanjem genetičke varijabilnosti amplifikacijom i sekvenciranjem COI gena dobijene su informacije o biodiverzitetu *Trichogramma* spp. uzorkovanih na teritoriji opštine Kikinda. Među testiranim jedinkama utvrđeno je 5 različitih haplotipova, od kojih su četiri haplotipa identifikovana kao *T. brassicae* (TbSERB-1, TbSERB-2, TbSERB-3, TbSERB-4), dok je jedan haplotip identifikovan kao *T. evanescens* (TeSERB-5). Među identifikovanih haplotipovima TbSERB-1 je najzastupljeniji, jer više od polovine testiranih jedinki pripada ovom haplotipu.

- Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da haplotip TbSERB-1, kao najzastupljeniji među testiranim uzorcima, karakteriše visoka stopa parazitizma u prirodnim uslovima, te se stoga može izvojiti kao adekvatan kandidat za upotrebu u biološkoj kontroli kukuruznog plamenca.

- Molekularnih tehnikama identifikovano je prisustvo *Wolbachia* bakterije u uzorcima prikupljenim u 2016. godini na teritoriji opštine Kikinda. Amplifikacijom 16S bakterijskog gena, prisustvo bakterije registrovano je samo kod jedinki koje pripadaju TbSERB-1 haplotipu i to kod 35,71% testiranih jedinki. Amplifikacijom i sekvenciranjem *wsp* bakterijskog gena, specifičnog za *T. brassicae* registrovano je prisustvo bakterije u 14,28% testiranih jedinki koje pripadaju haplotipu TbSERB-1.

- Korišćenjem specifičnih prajmera za *T. brassicae* i *T. evanescens* testirana je primenljivost multipleks lančane reakcije polimeraze za identifikaciju jedinki uzorkovanih u 2017. godini na 12 različitih lokaliteta u Vojvodini. Svi testirani uzorci u 2017. godini su rezultirali sa PCR produktom, što ukazuje da osim navedene dve vrste *Trichogramma* drugih vrsta parazitoida *O. nubilalis* na teritoriji Vojvodine najverovatnije nema ili su one retke. Vrsta *T. brassicae* je identifikovana u 97,47% testiranih uzoraka i u većini istraživanih lokaliteta u Vojvodini je predstavljala jedinu vrstu koja parazitira jaja *O. nubilalis*. Vrsta *T. evanescens* je, kao i u toku 2016. godine, identifikovana na području opštine Kikinda. U obe godine istraživanja *T. evanescens* je predstavljala retku vrstu, ali je u 2017. godini ipak detektovana u dva lokaliteta (Mokrin i Nakovo) i to u oba slučaja se razvila iz jaja kukuruznog plamenca koja su položila ženke druge generacije.

- Identifikacijom uzoraka iz 2017. godine sa lokaliteta Nakovo i Mokrin, iz istog parazitiranog jajnog legla kukuruznog plamenca registrovane su obe *Trichogramma* vrste (*T. brassicae* i *T. evanescens*), što ukazuje da ženke ovih vrsta prilikom odabira jajnog legla u koje će polagati jaja nisu odbijene od strane druge, konkurentne vrste, odnosno da mogu polagati čak i u jajna legla domaćina gde su pojedina jaja već parazitirana od strane druge vrste.

- Visoka stopa parazitiranosti jajnih legala kukuruznog plamenca autohtonim vrstama osica *Trichogramma*, koja je registrovana u prirodnim uslovima tokom ovog istraživanja na teritoriji Vojvodine u toku 2016. i 2017. godine, naročito kada je u pitanju vrsta *T. brassicae*, pokazuje da prisutne vrste i forme (haplotipovi) predstavljaju dobre kandidate za dalja istraživanja mogućnosti njihove praktične primene u komercijalnom uzgoju i intenzivnoj implementaciji biološkoj borbi protiv kukuruznog plamenca na teritoriji Vojvodine, Srbije i zemalja u okruženju.

- Za definisanje adekvatnih i ekonomski opravdanih strategija praktične primene autohtonih vrsta *Trichogramma* u biološkoj borbi, pored izbora odgovarajuće vrste i forme, te iznalaženja adekvatnih tehnika njihove efikasne proizvodnje u kontrolisanim uslovima, svakako je neophodno prethodno ispitati brojne biološke karakteristike kao što su: vitalnost jedinki, kapacitet leta i disperzija, fertilitet, preživljavanje u toku razvića, odnos polova u populacijama i s tim u vezi uticaj endosimbiontskih bakterija roda *Wolbachia*, dužina života imaga, sposobnost pronalaska i preferentnost pri izboru domaćina, uključujući i ostale vrste insekata domaćina, kompetitivnost u odnosu na ostale vrste parazitoida, te mogućnost gajenja u kontrolisanim uslovima. Stoga je sprovođenje dodatnih opsežnih istraživanja neophodno kako bi se u potpunosti odredila kompetentnost i pogodnost praktične primene autohtonih vrsta osica roda *Trichogramma* u biološkoj borbi protiv kukuruznog plamenca na teritoriji Srbije i širem okruženju.

7. LITERATURA

1. Alkarrat., H., 2013. Intra-and interspecific performance of *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) alimented with honey, pollen or honey-pollen mixtures. Dissertation. Faculty of Agricultural Science, Hohenheim University p. 155.
2. Almeida, R.P., Stouthamer, R., 2003. Molecular identification of *Trichogramma cacoeciae* Marshal (Hymenoptera: Trichogrammatiade): A new record from Peru. *Neotrop. Entomol.* 32:269-272.
3. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410 doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
4. Anderson, T.E., Echandi, E., Kennedy G.G., 1981. Transmission of the potato blackleg pathogen by European corn borer larvae. *Journal of Economic Entomology* 74: 630-633.
5. Arakaki, N., Miyoshi, T., Noda, H., 2001. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predator thrips *Franklinothrips vespiformis* (Tysanoptera, Insecta) *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268:(1) 011-016.
6. Bača, F., Almaši, R., Čamprag, D., Sekulić, R., 2002. Štetočine kukuruza i njihovo suzbijanje. *Bolesti, štetočine i korovi kukuruza i njihovo suzbijanje*, Novi Sad, 2002, 263 p.
7. Bača, F., Gošić-Dondo, S., Kaitović, Ž., Hadžistević, D. 2007: European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn) population fluctuation at Zemun Polje between 1986 and 2005, *Maydica*, Vol. 52, 325-328.
8. Bažok, R., Igrc-Barčić, J., 2010. Pheromon applications in maize pest control. *Novink*, Nova science Publishers, Inc., New York 35-52.
9. Beck, S.D. 1987. In: G.E.,Russell (ed.), *Developmental and seasonal biology of *Ostrinia nubilalis**. *Agricultural Zoology Reviews* 2: 59-96
10. Beglyarov, G.A., Smitnik, A.I., 1977. Seasonal colonization of entomophages in the USSR. In: Ridgway, R.L., S.B., Vinson (eds.), *Biological Control by Augmentation of Natural Enemies. Insect and mite control with parasites and predators*. New York: Plenum Press 283–328.

11. Bereś, K.P., 2012. Damage caused by *Ostrinia nubilalis* Hbn. to fodder maize (*Zea mays* L.), sweet maize (*Zea mays* VAR. *saccharata* [sturtev.] l.h. bailey) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) near rzeszów (south-eastern Poland) in 2008-2010. Acta Sci. Pol., Agricultura 11(3): 3-16.
12. Bethenod, M.T., Thomas, T. Y., Rousset, F., Frérot, B., Pélozuelo, L., Genestier, G., Bourguet, D., 2005. Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. II: assortative mating and host-plant preferences for oviposition. Heredity 94(2): 264–270.
13. Bigler, F., 1986. Mass production of *Trichogramma maidis* Pint. et Voeg. and its field application against *Ostrinia nubilalis* Hbn. in Switzerland. J App Entomol. 101: 23–29.
14. Boivin, G., 1994. Overwintering strategies of egg parasitoids, In: Wajnberg, E., S.A., Hassan (Eds.), Biological control with egg parasitoids. CAB International, Wallingford pp. 219-244.
15. Borghuis, A., Pinto, J.D., Platner, G.R., Stouthamer, R., 2004. Partial cytochrome oxidase II sequences distinguish the sibling species *Trichogramma minutum* Riley and *Trichogramma platneri* Nagarkatti. Biol. Control 30:90–94.
16. Bouchon, D., Rigaud, T., Juchault, P., 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: Molecular identification and host feminization. Proc. R. Soc. Lond. B 265:(1) 81-90.
17. Breeuwe, J.A.J., 1997. *Wolbachia* and cytoplasmatic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. Heredity, 7:41-47.
18. Bronnen, T.M., 2004. Resistance of Maize (*Zea mays* L.) against the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis* Hb.) and its association with Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften vorgelegt der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim 21 -28
19. Burbulis, P.P., Curl, G.D., Davis, C.P., 1977. Host searching behavior by *Trichogramma nubilaleon* corn. Environ Entomol. 6(3): 400-402.
20. Čamprag, D., 2000. Integralna zaštita ratarskih kultura od štetočina. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Institut za zaštitu bila i životne sredine“Dr Pavle Vukasović”, 215 p.
21. Čamprag, D., 2002. Štetočine kukuruza. Bolesti, štetočine i korovi kukuruza i njihovo suzbijanje, Novi Sad, pp. 269-271.

22. Čamprag, D., Krnjaić, Đ., Maceljčki, M., Maček, J., Marić, A., Vrabl, S., 1983. Priručnik izveštajne i prognozne službe zaštite poljoprivrednih kultura. Beograd: Savez društava za zaštitu bilja Jugoslavije 682 p.
23. Čamprag, D., Sekulić, R., Kereši, T., Bača, F. (2004): Kukuruzna sovica (*Helicoverpa armigera* Hübner) i integralne mere suzbijanja. Poljoprivredni fakultet, Institut za zaštitu bilja i životne sredine "Dr Pavle Vukasović", Novi Sad, 183 p.
24. Cerutti, F., Bigler, F., 1995. Quality assessment of *Trichogramma brassicae* in the laboratory. *Entomol Exp App.* 75(1):19-26.
25. Chang, S.C., Hu, N.T., Hsin, C.Y., Sun, C.N., 2001. Characterization of differences between two *Trichogramma* wasps by molecular markers. *Biol. Control* 21(2):75–78.
26. Ciociola, A.I. Jr, Querino, R.B., Zucchi, R.A., Stouthamer, R., 2001a. Molecular tool for identification of closely related species. A molecular key to the common species of *Trichogramma*: *T. rojasi* Nagaraja and *T. lasallei* Pinto. *Neotrop Entomol.* 30(4):575–578.
27. Ciociola, A.I. Jr, Zucchi, R.A., Stouthamer, R., 2001b. Molecular key to seven Brazilian species of *Trichogramma* using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. *Neotrop Entomol.* 30(2):259–262.
28. Coffrey, D., Worthley, L.H., 1927. A progress report on the investigation of the European corn borer. *USDA Bull.* 1476: 1-154.
29. Colinet, H., Boivin, G., 2011. Insect parasitoids cold storage: A comprehensive review of factors of variability and consequences. *Biol. Control* 58: 83-95.
30. Curtis, C.P., 1940. *Entomophagous insects*. McGraw-Hill Publishing Co., London 688 pp.
31. Dang, X.L., Wen, S.Y., He, X.F., Pang, X.F., 2005. M-PCR: a powerful method for rapid molecular identification of *Trichogramma* wasps. *Insect Science* 12:77–85.
32. De Almeida, R.P., 2004. *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: Identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of *Wolbachia* symbionts [dissertation]. [Wageningen]: Wageningen University 150 p.
33. DeBach, P., Hagen, K.S., 1964. Manipulation entomophagous species. In: DeBach, P., (Editor), *Biological control of insect pests and weeds*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 429-458.
34. Del-Pino, M., Rugman-Jones, P., Hernandez-Suarez, E., Polaszek, A., Stouthamer, R., 2013. Rapid molecular identification of five *Trichogramma* occurring in the Canary Islands with notes on their distribution in banana groves. *Biocontrol* 58:515-524.

35. Doutt, R.L., Viggiani, G., 1968. The classification of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Proceedings of the California Academy of Sciences. 35: 477-586.
36. Drost, Y.C., Qiu, Y.T., Posthuma-Doodeman, C.J.A.M., Van Lenteren, J.C., 2000. Comparison of searching strategies of five parasitoid species of *Bemisia argentifolli* Bellow and Perring (Hom., Aleyrodidae). J. Appl. Entomol. 124:105-112.
37. Edwards, C.A., 1986. Agrochemicals as environmental pollutants. In: Van Hofsten, B., Eckstrom, G. (Eds.), Control of pesticide applications and residues in food. A guide and directory. Swedish Science Press, Uppsala, pp. 1-19.
38. EPPO, 2002. PM 6/3(2). Safe use of biological control. List of biological control agents widely used in the EPPO region. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 32, pp. 447–461.
39. Espana-Luna, M.P., Alvarado-Gomez, O.C., Gonzalez-Hernandez, A., Lozano-Gutierrez, J., 2008. Identificación molecular de especies crípticas de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de importancia Agrícola en México. Acta Zool. Mex. 24:1-14
40. Fahriye, S., Tuncbilek, A.S., Oztemiz, S., Pintureau, B., Rugman-Jones, P., Stouthamer, R., 2009. Molecular key to the common species of *Trichogramma* of the Mediterranean region. BioControl 54:(5)617-624
41. Flander, S.E., Quednau, W., 1960. Taxonomy of the genus *Trichogramma*. Entomophaga 4: 285-294
42. Flanders, S.E., 1937. Control of sex and sex-limited polymorphisms in Hymenoptera. Quart. Rev. Biol. 21, 135-143.
43. 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. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3:294–299.
44. Gibson, G.A.P., Huber, J.T., Woolley, J.B., 1997. Annotated keys to the genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). NRC Research Press, Canada 794p.
45. Godfrey, L.D., Holtzer T.O., Norman J.M., 1991. Effects of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) tunneling and drought stress on field corn gas exchange parameters. Journal of Economic Entomology 84(4):1370-1380.
46. Greenberg, S., 1991. Evolution techniques for *Trichogramma* quality. In: Bigler F, (editor), Proceedings of the 5th Workshop of the IOBC Global Working Group

- “Quality Control of Mass Reared Arthropods”. 1991 March 25-28; Wageningen, Netherland. Zurich: Swiss Federal Research Station for Agronomy pp. 138-145.
47. Hajek, E.A., 2004. *Natural Enemies: An introduction to biological control*. Cambridge University Press. Cambridge 396 p.
 48. Hassan, S.A., 1981. Mass-production and utilization of *Trichogramma*: 2. Four years successful biological control of the European corn borer. *Mededelingen van de faculteit Land-bouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 46(2):417–427.
 49. Hassan, S.A., 1993. The mass rearing and utilization of *Trichogramma* to control lepidopterous pests: achievements and outlook. *Pesticide Science* 37(4):387–391.
 50. Hassan, S.A., 1997. Seleção de espécies de *Trichogramma* para o uso em programas de controle biológico. In: Parra, J.R.P., Zucchi, R.A (eds.), *Trichogrammae o Controle Biológico Aplicado*. FEALQ, Piracicaba, Brasil, pp.183-206
 51. Hebert, P.D.N., Cyminska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270:313–321.
 52. Hiemstra, M., Toonen, A., De Kok, A., 1999. Determination of benzoylphenylurea insecticides in pome fruit and fruiting vegetables by liquid chromatography with diode array detection and residue data obtained in the Dutch national monitoring program. *Journal of AOAC International* 82,1198-1205.
 53. Hill, D.S., 1987. *Agricultural insect pests of temperate regions and their control*. Cambridge University Press 659 p.
 54. Hoffman, A.A., Truelli, M., 1997. Cytoplasmatic incompatibility in insects. In: O’Neill, S.L., Hoffmann, A.A., J.H., Werren, (Eds.), *Influential Passengers*, Oxford University Press, Oxford. 42-80
 55. Hohmann, C.L., Luck, R.F., Stouthamer, R., 2001. Effect of *Wolbachia* on the survival and reproduction of *Trichogramma kaykai* Pinto & Stouthamer (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotrop. Entomol.* 30:607-612.
 56. Howard, L.O., Fiske, W.F., 1911. The importation into the United States of parasites of the Gypsy Moth and the Brown-tail Moth. *USDA Bulletin* 91: 344pp
 57. Hugger, H., 1998. Was ist von transgenen Maissorten zu erwarten? *Mais* 26: 112-113.
 58. Huigens, M.E., Stouthamer, R., 2003. Parthenogenesis associated with *Wolbachia*. In: Bourtzis K, T.A., Miller (Eds). *Insect symbiosis*. Boca Raton: CRC press, US p. 247-266.
 59. Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M., Von der Schulenburg, J.H.G., Bertrand, D., West, S.A., Goriacheva, I.I., Zakharov, I.A., Werren, J.H., Stouthamer, R., Mejerus, M.E.N.,

1999. Male killing *Wolbachia* in two species of insects. Proc. R. Soc. Lond. B 266:735-740.
60. Ilić, I., Jovanović, S., Janković-Miličić, V., 2016. Forecasting corn production in Serbia using Arima model. Economics of Agriculture 63 (4):1141-1156.
61. Ivezić, A., Rugman-Jones, P., Stouthamer, R., Ignjatović-Ćupina, A., 2018. Molecular identification of *Trichogramma* egg parasitoids of *Ostrinia nubilalis* in the north eastern Serbia. Archives of Biological Sciences 70 (3): 425-432.
62. Ivović, D., 2015. Suzbijanje kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) u usevu semenskog kukuruza. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine 49 p.
63. Jovanić, M., 1969. Određivanje momenta i potrebe hemijskog suzbijanja kukuruznog plamenca. Savremena poljoprivreda 5-6.
64. Kageyama, D., Hoshizakim S., Ishikawa, Y., 1998. Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnicalis*: Evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insects. Heredity, 81:311-316.
65. Kazmer, D.J., Luck, R.F., 1995. Field test of the size-fitness in the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. Ecology 76(2):412-425.
66. Kereši T, Vajgand D, Milovac Ž, 2014. Važnije štetočine kukuruza iz reda Lepidoptera. Biljni lekar 42 (2-3): 184-199.
67. Knutson, A., 1998. The *Trichogramma* manual: A guide to the use of *Trichogramma* for biological control with special reference to augmentative releases for control of bollworm and budworm in cotton, Texas Agricultural Extension Service, The Texas A&M University System, US 44 p.
68. Kot, J., 1979. Analysis of factors affecting the phytophage reduction by *Trichogramma* Westw. species. Pol. Ecol. Stud. 5:5-59.
69. Krnjajić, S., 2002. Dinamika populacija jajnih parazitoida kupusne sovice (*Mamestra brassicae* L.) sa osvrtom na mogućnost korišćenja *Trichogramma evanescens* Westwood u suzbijanju štetočina iz reda Lepidoptera. Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet. 71 p.
70. Laurent, V., Vanlerberghe-Masutti, F., Wajnberg, E., Mangin, B., Goffinet, B., 1996. Genetic mapping of *Trichogramma brassicae* genome with RAPD markers. XX International Congress of Entomology, August 25-31, 1996 (Proceedings).

71. Leahy, T.C., Andow, D.A., 1994. Egg weight, fecundity and longevity are increased by adult feeding in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America* 87: 342-347.
72. Lewis, L.C. 1975. Natural regulation of crop pests in their indigenous ecosystems and in Iowa agrosystems: bioregulation of economic insect pests. *Iowa State J. Res.* 49:435-445.
73. Li, Li-Ying. 1994. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: A survey. In: Wajnberg, E., S.A., Hassan (Eds.), *Biological Control with Egg Parasitoids*. Oxon, U.K., CAB International. pp. 37-53.
74. Lopez, J.D., Morrison., R.K. Jr, 1980. Overwintering of *Trichogramma pretiosum* in Central Texas. *Environ. Entomol.* 9:75-78.
75. Luck, R.F., Stouthamer, R., Nunney, L., 1992. Sex determination and sex ratio patterns in parasitic Hymenoptera. In: Wrench D.L., M.A., Ebbert (Eds), *Evolution and Diversity of Sex Ratio in Haplodiploid Insects and Mites*, Chapman & Hall, New York pp. 442-476.
76. Maceljiski, M., 2002. *Poljoprivredna entomologija*. Zrinski d.d., Čakovec, Hrvatska, 519 p.
77. Manninger, G.A., 1968. Prognoza pojave poljoprivrednih štetnika u Mađarskoj. Dokumentacija za teh. i teh u poljoprivredi, Beograd 1-6.
78. Mihajlović, L.J., (2016). *Šumarska entomologija*. Šumarski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd 877p.
79. Mihajlović, Lj., 2018. Ekološki i ekonomski značaj faune nadfamilije Chalcidoidea Srbije (Insecta: Hymenoptera). *Zbornik radova SANU*, Beograd 313-339.
80. Molnar, I., 2004. Osnovni principi integralne biljne proizvodnje. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Eko konferencija.
81. Nagaratti, S., Nagaraja, H., 1968. Biosystematic studies on *Trichogramma* species: I. Experimental hybridization between *Trichogramma austriaticum* Girault, *T. evanescens* Westwood, and *T. minutum* Riley. *Tech Bull.* 10:81-96.
82. Nagarkatti, S., Nagaraja, H., 1971. Redescriptions of some known species of *Trichogramma* showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. *Bull. Entl. Res.* 61(1):13-31.
83. Nagy, B., (1993). European corn borer (*Ostrinia nubilalis* (Hübner), Budapest. pp. 495-529.

84. Nasari, M.F., Hagedorn, G., Buttner, C., Reichmuth, C., Scholler, M., 2013. Molecular identification of *Trichogramma* species from Pakistan, using ITS2 region of rDNA: *BioControl* 58:483-491
85. Nazeri, M., Ashouri, A., Hosseini, M., 2015. Can *Wolbachia* infection improve qualitative characteristics of *Trichogramma brassicae* reared on cold stored eggs of the host? *Int. J. Pest. Manag.* 61(3): 243-249.
86. Nordin J.H., Cui Z. & Yin C.M. 1984: Cold-induced glycerol accumulation by *Ostrinia nubilalis* larvae is developmentally regulated. *Journal of Insect Physiology* 30: 563-566.
87. Nordlund, D.A., 1994. Habitat location by *Trichogramma*. In: Wajnberg, E., S.A., Hassan (Eds), *Biological Control with Egg Parasitoids*. CAB International, Wallingford, UK pp. 155–164.
88. Nordlund, D.A., Lewis, W.J., Gross, Jr H.R., Beevers, M., 1981. Kairomones and their use for management of entomophagous insects. XII. The stimulatory effects of host eggs and the importance of host-egg density to the effective use of kairomones for *Trichogramma pretiosum*. *Riley. J. Chem. Ecol.* 7:909-17.
89. O' Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M.F., Karr, T.L., Robertson, H.M., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89(2):699-702.
90. Oliveira, H.N., Zanuncio, J.C., Pratisoli, D., Picanco, M.C., 2003. Biological characteristics of *Trichogramma maxacalii* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on eggs of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Journal of Biology* 63 (4): 647 – 653.
91. Olkowski, W., Zhang, A., 1990. *Trichogramma* modern day frontier in biological control. *The IPM Practitioner* 12:1-15.
92. Oztemiz, S., 2007. *Trichogramma* species egg parasitoids of *Lepidoptera* in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 109(3):718–720.
93. Pak, G.A., Oatman, E.R., 1982. Biology of *Trichogramma brevicapillum*. *Ent. Exp. and Appl.* 32: 61-67.
94. Pavić, P., 2016. Dinamika pojave i mogućnosti praćenja pojave kukuruznog moljca u Sinskom polju. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. 40 p.
95. Pinto, J.D., 1997. Chapter 22. Trichogrammatidae. In: Gibbons, G.A.P., Hubner, J.T., J.B., Woolley (Eds.), *Annotated Keys to the Genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)*. NRC research press, Ottawa, Canada, pp. 726-752

96. Pinto, J.D., 2006. A review of the New World genera of Trichogrammatidae (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*. Vol. 15, pp. 38-163.
97. Pinto, J.D., Koopmanschap, A.B., Platner, G.R., Stouthamer, R., 2002. The North American *Trichogramma* parasitizing certain *Tortricidae* (Lepidoptera) on apple and pear with ITS2 DNA characterization and description of a new species. *Biol. Control* 23(2):134–142.
98. Pinto, J.D., Stouthamer, R., 1994. Systematics of the *Trichogrammatidae* with emphasis on *Trichogramma*. In: Wajberg, E., S.A., Hassan (Eds), *Biological control with egg parasitoids*. Wallingford: Cab International p. 1-36.
99. Pinto, J.D., 1999. The systematics of the North American species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Memoirs of the Entomological Society of Washington* 22: 1-287.
100. Pintureau, B., 1987. Systématique évolutive du genre *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) en Europe. [dissertation]. [Paris]: Université Paris VII. 311 p.
101. Pintureau, B., Stefanescu, C., Kenis, M., 2000. Two new European species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 36 (4):417-422.
102. Ponsard, S., Bethenod, M.T., Bontemps, A., Pélozuelo, L., Souqual, M. C., Bourguet, D., 2004. Carbon stable isotopes: a tool for studying the mating, oviposition, and spatial distribution of races of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, among host plants in the field. *Canadian Journal of Zoology* 82(7):1177-1185.
103. Popović, B., Tanasković, S., Gvozdenac, S., Vuković, S., 2015. Kukuruzni plamenac *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera: Crambidae) kao štetočina. *XX savetovanje o biotehnologiji* 20(22): 555-562.
104. Querino, R.B., Zucchi, R.A., Monteiro, R.C., 2010. Diversity and hosts of *Trichogramma* in the New World, with emphasis in South America, In: Consoli, F.L., Parra, J.R.P., R.A., Zucchi (Eds.), *Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma*. 1st ed. New York: Springer, vol. 1, pp. 219-236.
105. Raspudić, E., Ivezić, M., Mlinarević, M., 1999. Utjecaj transgenih Bt hibrida kukuruza na kukuruznog moljca (*Ostrinia nubilalis* Hübner). *Sažeci priopćenja 43. seminara iz Zaštite bilja Opatija* 09. –11. 02. 1999. *Glasnik zaštite bilja*, 1: 6-7.

106. Raspudić, E., Sarajlić, A., Ivezić, M., Majić, Brmež, M., I., Gumze, A. (2013). Učinkovitost kemijskog suzbijanja kukuruznog moljca u sjemenskom kukuruzu. *Poljoprivreda* 19 (1): 11-15.
107. Razinger, J., Vasileiadis, V.P., Giraud, M., Dijk, W., Modic, Š., Sattin, M., Urek, G., 2016. On-farm evaluation of inundative biological control of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) by *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in three European maize-producing regions. *Pest Manag. Sci.* 72: 246-254.
108. Rechcigl, J.E., Rechcigl, N.A., 2000. Biological and biotechnological control of insects pest. Boca Raton: CRC Press 375 p.
109. Reid, L.M., Hamilton, R.I., Mather, D.E., 1996. Screening maize for resistance to Gibberella Ear Rot. Agriculture and Agri-Food Canada technical bulletin 40 p.
110. Ruberson, J. R., Kring T.J., 1993. Parasitism of developing eggs by *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Host age preference and suitability. *Biological Control* 3:39-46.
111. Sappal, N.P., Jeng, R.S., Hubbes, M., Liu, F., 1995. Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three *Trichogramma* species. *Genome* 38:419–425.
112. Sarajlić, A., Raspudić, E., Lončarić, Z., Josipović, M., Brmež, M., Ravlić, M., Zebec, V., Majić, I., 2017: Significance of irrigation treatments and weather conditions on European corn borer appearance. *Maydica*. 62-M20: 1-8.
113. Silva, I.M.M.S., Honda, J., Van Kan, F., Hu, S.J., Neto, L., Pintureau, B., Stouthamer, R., 1999a. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *BioControl* 16(2):177–184.
114. Silva, I.M.M.S., Van Meer, M.M.M., Roskam, M.M., Hoogenboom, A., Gort, G., Stouthamer, R., 1999b. Biological control potential of *Wolbachia*-infected versus uninfected wasps: laboratory and greenhouse evaluation of *Trichogramma cordubensis* and *T. deion* Strains. *Biocontrol Sci. Technol.* 10:223-238.
115. Smith, H.E., 1920. Broom corn, the probable host in which *Pyrausta nubilalis* Hubn. Reached America. *J. Econ. Entomol.* 59: 915-921.
116. Smith, S.M., 1996. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. *Annu Rev Entomol.* 41:375–406.
117. Starčević, Lj., Malešević, M., Marinković, B., Crnobarac, J., Panković, L., Latković, D., Jaćimović, G., 2006. Agrotehnika ratarskih biljaka. XL seminar agronoma 1966-

2006. Zlatibor, Naučni institute za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Zbornik referata, pp. 306-319.
118. Stouthamer, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In: O'Neill, S.L., Hofmann A.A., J.H., Werren (Eds.), *Influential passengers: inherited microorganisms and invertebrate reproduction*. New York: Oxford University Press. pp. 102-124.
119. Stouthamer, R., 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In: O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., J.H., Werren (Eds.), *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford. 102-124.
120. Stouthamer, R., Hu, J., Van Kan, F.J.P.M., Platner, G.R., Pinto, J.D., 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *BioControl* 43(4):421–440.
121. Stouthamer, R., Gai, Y., Koopmanschap, A.B., Platner, G.R., Pinto, J.D., 2000a. ITS2 sequences do not differ for closely related species *Trichogramma minutum* and *T. platneri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95(1): 105-111.
122. Stouthamer, R., Jochemsen, P., Platner, G.R., Pinto, J.D., 2000b. Crossing incompatibility between *Trichogramma minutum* and *T. platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): implications for application in biological control. *Environ. Entomol.* 29:832–837.
123. Stouthamer, R., Kazmer, D.J., 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity* 73: 317-327.
124. Stouthamer, R., Luck, R.F., 1993. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. *Entomol. Exp. Appl.* 67:183-192.
125. Strand, M.R., 1986. Physiological interactions of parasitoids and hosts. In: Waage, J., D., Greathead (Eds.), *Insect Parasitoids*. Academic Press, London. pp. 109-118.
126. Sumer, F., Tuncbilek, A.S., Oztemiz, S., Pintureau, B., Rugman-Jones, P., Stouthamer, R., 2009. A molecular key to the common species of *Trichogramma* of the Mediterranean region. *Biocontrol* 54:617-624.
127. Suverkropp, B.P., Bigler, F., Van Lenteren, J.C., 2001. Temperature influences walking speed and walking activity of *Trichogramma brassicae* (Hym., Trichogrammatidae). *J. Appl. Entomol.* 125:303-307.
128. Tancik, J., (2017). Natural parasitism of the second generation European Corn Borer Eggs *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera, Pyralidae) by *Trichogramma* spp. in

- sweet corn fields in Vojvodina, Serbia. *Plant protection science* 53 (1): 50-54.
129. Thomson, L., Rundle, B.J., Carew, M.E., Hoffmann, A.A., 2003. Identification and characterization of *Trichogramma* species from south-eastern using the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the ribosomal gene complex. *Entomol. Exp. App.* 106(3):235–240.
 130. Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A., Warman, M.L., 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29(1):52-54.
 131. Vajgand, D., 2014. The major maize pests of the order Lepidoptera, *Biljni lekar*, 42:(2-3) 187-193.
 132. Van Driesche, R., Bellows, T.S. Jr, 1996. *Biological control*. New York: Chapman and Hall 539 p.
 133. Van Lenteren, J.C., 2000. Success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies. In: Gurr G, Wratten S, editors. *Biological control: measures of success*. London: Kluwer Academic Publishers p. 77-103.
 134. Van Lenteren, J.C., Bueno, V.H.P., 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *BioControl* 48,123-139.
 135. Van Schelt, J., Ravensberg, W.J., 1991. Some aspects on the storage and application of *Trichogramma maidis* in corn. In: Wajnberg, E., S.B., Vinson (Eds.), *The Third International Symposium on Trichogramma and other Egg Parasitoids; 1990 September 23-27; San Antonio, USA*. Paris: Institut nationale de la recherche agronomique p. 239-242.
 136. Vukašinović, E., 2014. Analiza lipida i masnih kiselina nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.) (Insecta: Lepidoptera), Doktorska disertacija, Novi Sad.
 137. Wang, B., Ferro, D.N., Hosmer, D.W., 1999. Effectiveness of *Trichogramma ostrinae* and *T. nubilale* for controlling the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in sweet corn. *Entomol. Exp. App.* 91:297–303.
 138. Wang, Z., Smith, S.M., 1996. Phenotypic differences between thelytokous and arrhenotokous *Trichogramma minutum* from *Zeiraphera canadensis*. *Entomol. Exp. Appl.* 78:315-323.
 139. Werren, J.H., Windsor, D., Guo L.R., 1995. Distribution of *Wolbachia* among Neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B* 262: 197-204.

140. Werren, J.H., Windsor, D.M., 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 1277-1285.
141. Whitman, D., Nordlund, D.A., 1994. Plant chemicals and the location of herbivorous arthropods by their natural enemies. In: Ananthakrishnan, T.N. (Editor), Functional Dynamics of Phytophagous Insects. New Delhi: Oxford and IBH Publishing p. 207–248.
142. Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S., 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 265:509-515.
143. Zucchi RA, Querino RB, Monteiro RC. 2010. Diversity and hosts of *Trichogramma* in the New World, with emphasis in South America. In: Consoli, F.L., Parra, J.R.P., R.A., Zucchi (Eds.), Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma*. Springer, New York, New York pp. 219–236.
144. Portal prognozno-izveštajne službe zaštite bilja. Available at: <http://www.pisvojvodina.com/default.aspx>
145. Index to the Canadian National Collection (CNC) of Insects, Arachnids and Nematodes Web Site. Available at: <http://www.canacoll.org>.
146. Natural history museum. Available at: <https://www.nhm.ac.uk>.
147. National Center for Biotechnology Information - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

PRILOZI

PRILOG 1. Brojnost adulta *Ostrinia nubilalis* u svetlosnim klopka postavljenim na lokalitetima Kikinda i Banatska Topola u 2016. Godini

Mesec	Datum sakupljanja	Broj adulta u klopki		Mesec	Datum sakupljanja	Broj adulta u klopki			
		Kikinda	Banatska Topola			Kikinda	Banatska Topola		
April	04.04.2016	0	0	Jun	01.06.2016	61	45		
	05.04.2016	0	0		02.06.2016	42	31		
	06.04.2016	0	0		03.06.2016	38	41		
	07.04.2016	0	0		04.06.2016	35	32		
	08.04.2016	0	0		05.06.2016	68	55		
	09.04.2016	0	0		06.06.2016	73	111		
	10.04.2016	0	0		07.06.2016	65	72		
	11.04.2016	0	0		08.06.2016	87	95		
	12.04.2016	0	0		09.06.2016	93	125		
	13.04.2016	0	0		10.06.2016	98	73		
	14.04.2016	0	0		11.06.2016	131	116		
	15.04.2016	0	0		12.06.2016	33	54		
	16.04.2016	0	0		13.06.2016	55	62		
	17.04.2016	0	0		14.06.2016	82	51		
	18.04.2016	0	0		15.06.2016	65	42		
	19.04.2016	0	0		16.06.2016	24	17		
	20.04.2016	0	0		17.06.2016	37	22		
	21.04.2016	0	0		18.06.2016	31	27		
	22.04.2016	0	0		19.06.2016	22	19		
	23.04.2016	0	0		20.06.2016	82	26		
	24.04.2016	0	0		21.06.2016	122	22		
	25.04.2016	0	0		22.06.2016	65	15		
	26.04.2016	0	0		23.06.2016	78	19		
	27.04.2016	0	0		24.06.2016	23	8		
	28.04.2016	0	0		25.06.2016	17	11		
	29.04.2016	0	0		26.06.2016	11	14		
	30.04.2016	0	0		27.06.2016	7	6		
	Maj	01.05.2016	0		0	Jul	01.07.2016	7	4
		02.05.2016	0		0		02.07.2016	5	2
		03.05.2016	0		0		03.07.2016	27	12
04.05.2016		0	0	04.07.2016	12		25		
05.05.2016		0	1	05.07.2016	10		8		
06.05.2016		0	0	06.07.2016	24		20		
07.05.2016		0	1	07.07.2016	12		9		
08.05.2016		0	0	08.07.2016	11		16		
09.05.2016		0	2	09.07.2016	8		13		
10.05.2016		.	2	10.07.2016	7		6		
11.05.2016		8	0	11.07.2016	3		7		
12.05.2016		5	2	12.07.2016	6		4		
13.05.2016		5	2	13.07.2016	37		25		
14.05.2016		0	0	14.07.2016	19		7		
15.05.2016		2	2	15.07.2016	8		3		
16.05.2016		2	1	16.07.2016	9		4		
17.05.2016		0	0	17.07.2016	87		35		
18.05.2016		1	1	18.07.2016	115		48		
19.05.2016		0	5	19.07.2016	116		63		
20.05.2016		5	7	20.07.2016	152		56		
21.05.2016		8	6	21.07.2016	259		118		
22.05.2016	6	7	22.07.2016	288	136				
23.05.2016	5	10	23.07.2016	218	157				
24.05.2016	4	4	24.07.2016	653	514				
25.05.2016	11	9	25.07.2016	862	1050				
26.05.2016	26	21	26.07.2016	691	760				
27.05.2016	187	112	27.07.2016	1022	2652				
28.05.2016	146	134	28.07.2016	1141	2328				
29.05.2016	.	87	29.07.2016	1275	2322				
30.05.2016	147	62	30.07.2016	1137	1812				
31.05.2016	173	84	31.07.2016	2248	2216				

PRILOG 1. Brojnost adulta *Ostrinia nubilalis* u svetlosnim klopka postavljanim na lokalitetima Kikinda i Banatska Topola u 2016. godini (nastavak)

Mesec	Datum sakupljanja	Broj adulta u klopki	
		Kikinda	Banatska Topola
Avgust	01.08.2016	922	1245
	02.08.2016	2705	2350
	03.08.2016	1788	2413
	04.08.2016	2531	2215
	05.08.2016	1752	1985
	06.08.2016	1825	1677
	07.08.2016	562	752
	08.08.2016	810	648
	09.08.2016	754	840
	10.08.2016	310	520
	11.08.2016	195	224
	12.08.2016	153	184
	13.08.2016	143	111
	14.08.2016	81	53
	15.08.2016	370	262
	16.08.2016	205	92
	17.08.2016	258	97
	18.08.2016	200	62
	19.08.2016	183	70
	20.08.2016	132	65
	21.08.2016	112	32
	22.08.2016	43	22
	23.08.2016	100	132
	24.08.2016	87	136
	25.08.2016	106	194
	26.08.2016	123	178
	27.08.2016	97	155
	28.08.2016	46	58
	29.08.2016	110	142
	30.08.2016	65	103
	31.08.2016	47	58
Septembar	01.09.2016	145	106
	02.09.2016	93	111
	03.09.2016	71	103
	04.09.2016	31	53
	05.09.2016	10	12
	06.09.2016	120	153
	07.09.2016	195	213
	08.09.2016	140	75
	09.09.2016	94	72
	10.09.2016	55	38
	11.09.2016	71	33
	12.09.2016	100	75
	13.09.2016	92	68
	14.09.2016	36	22
	15.09.2016	58	18
	16.09.2016	49	25
	17.09.2016	28	22
	18.09.2016	22	15
	19.09.2016	10	17
	20.09.2016	6	9
	21.09.2016	3	6
22.09.2016	0	0	
23.09.2016	0	0	
24.09.2016	0	0	
25.09.2016	6	2	
26.09.2016	3	2	
27.09.2016	1	1	
28.09.2016	6	0	
29.09.2016	0	0	
30.09.2016	0	0	
Oktobar	01.10.2016	0	0
	02.10.2016	0	0
	03.10.2016	0	0
	04.10.2016	0	0
	05.10.2016	0	0

PRILOG 2. Brojnost adulta *Ostrinia nubilalis* u svetlosnim klopka postavljanim na lokalitetima Kikinda i Banatska Topola u 2017. godini

Mesec	Datum sakupljanja	Broj adulta u klopki		Mesec	Datum sakupljanja	Broj adulta u klopki	
		Kikinda	Banatska Topola			Kikinda	Banatska Topola
April	01.04.2017	0	0	Jun	01.06.2017	243	147
	02.04.2017	0	0		02.06.2017	177	128
	03.04.2017	0	0		03.06.2017	111	115
	04.04.2017	0	0		04.06.2017	43	232
	05.04.2017	0	0		05.06.2017	205	66
	06.04.2017	0	0		06.06.2017	96	31
	07.04.2017	0	0		07.06.2017	35	16
	08.04.2017	0	0		08.06.2017	17	9
	09.04.2017	0	0		09.06.2017	14	6
	10.04.2017	0	0		10.06.2017	16	7
	11.04.2017	0	0		11.06.2017	39	3
	12.04.2017	0	0		12.06.2017	98	32
	13.04.2017	0	0		13.06.2017	75	27
	14.04.2017	0	0		14.06.2017	10	8
	15.04.2017	0	0		15.06.2017	14	5
	16.04.2017	0	0		16.06.2017	11	9
	17.04.2017	0	0		17.06.2017	4	2
	18.04.2017	0	0		18.06.2017	55	7
	19.04.2017	0	0		19.06.2017	9	5
	20.04.2017	0	0		20.06.2017	12	3
	21.04.2017	0	0		21.06.2017	5	3
	22.04.2017	0	0		22.06.2017	20	3
	23.04.2017	0	0		23.06.2017	4	9
	24.04.2017	0	0		24.06.2017	8	6
	25.04.2017	0	0		25.06.2017	15	6
	26.04.2017	0	0		26.06.2017	9	11
	27.04.2017	0	0		27.06.2017	21	1
	28.04.2017	0	0		28.06.2017	11	3
	29.04.2017	0	0		29.06.2017	10	5
	30.04.2017	0	0		30.06.2017	3	1
Maj	01.05.2017	0	0	Jul	01.07.2017	6	1
	02.05.2017	0	0		02.07.2017	13	7
	03.05.2017	0	0		03.07.2017	10	5
	04.05.2017	0	1		04.07.2017	20	5
	05.05.2017	1	1		05.07.2017	25	7
	06.05.2017	0	0		06.07.2017	21	6
	07.05.2017	1	2		07.07.2017	18	11
	08.05.2017	0	0		08.07.2017	23	19
	09.05.2017	0	0		09.07.2017	4	1
	10.05.2017	1	1		10.07.2017	7	2
	11.05.2017	0	0		11.07.2017	4	7
	12.05.2017	2	1		12.07.2017	27	10
	13.05.2017	3	2		13.07.2017	13	7
	14.05.2017	3	2		14.07.2017	41	28
	15.05.2017	4	2		15.07.2017	8	2
	16.05.2017	7	2		16.07.2017	16	7
	17.05.2017	6	4		17.07.2017	10	23
	18.05.2017	10	5		18.07.2017	59	20
	19.05.2017	10	6		19.07.2017	159	35
	20.05.2017	23	5		20.07.2017	210	35
	21.05.2017	43	7		21.07.2017	188	49
	22.05.2017	11	11		22.07.2017	217	56
	23.05.2017	44	11		23.07.2017	238	102
	24.05.2017	37	8		24.07.2017	70	76
	25.05.2017	51	14		25.07.2017	28	11
	26.05.2017	47	13		26.07.2017	91	60
	27.05.2017	59	14		27.07.2017	25	15
	28.05.2017	42	18		28.07.2017	42	29
	29.05.2017	39	21		29.07.2017	59	44
	30.05.2017	82	26		30.07.2017	102	308
	31.05.2017	295	38		31.07.2017	391	90

PRILOG 2. Brojnost adulta *Ostrinia nubilalis* u svetlosnim klopka postavljanim na lokalitetima Kikinda i Banatska Topola u 2017. godini (nastavak)

Mesec	Datum sakupljanja	Broj adulta u klopci	
		Kikinda	Banatska Topola
Avgust	01.08.2017	435	86
	02.08.2017	304	69
	03.08.2017	210	64
	04.08.2017	132	51
	05.08.2017	67	32
	06.08.2017	33	11
	07.08.2017	14	4
	08.08.2017	21	10
	09.08.2017	14	3
	10.08.2017	53	4
	11.08.2017	31	13
	12.08.2017	9	3
	13.08.2017	10	8
	14.08.2017	8	2
	15.08.2017	14	6
	16.08.2017	24	4
	17.08.2017	25	9
	18.08.2017	31	3
	19.08.2017	16	5
	20.08.2017	14	2
	21.08.2017	1	0
	22.08.2017	2	1
	23.08.2017	0	1
	24.08.2017	9	4
	25.08.2017	14	7
	26.08.2017	21	10
	27.08.2017	8	18
	28.08.2017	13	43
	29.08.2017	15	14
	30.08.2017	17	21
	31.08.2017	12	8
Septembar	01.09.2017	9	3
	02.09.2017	4	0
	03.09.2017	1	0
	04.09.2017	6	0
	05.09.2017	9	2
	06.09.2017	55	26
	07.09.2017	18	1
	08.09.2017	14	4
	09.09.2017	19	11
	10.09.2017	125	0
	11.09.2017	70	28
	12.09.2017	19	5
	13.09.2017	3	2
	14.09.2017	19	8
	15.09.2017	21	10
	16.09.2017	11	7
	17.09.2017	1	0
	18.09.2017	0	0
	19.09.2017	2	0
	20.09.2017	0	0
	21.09.2017	0	0
	22.09.2017	0	0
	23.09.2017	0	0
	24.09.2017	0	0
	25.09.2017	7	4
	26.09.2017	7	3
	27.09.2017	0	0
	28.09.2017	0	0
	29.09.2017	0	1
	30.09.2017	0	0

PRILOG 3. Sekvence ITS2 gena *Trichogramma* jedinki uzorkovanih u 2016. godini.

ALEX-1 Trichogramma brassicae

ATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAA
AAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGTCTC
TATCTCT-----CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNATCTGGCTCGTCCATGCATCGGTCATTGAACGCGCGCG
CGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTC

ALEX-2 Trichogramma brassicae

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTAACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCTCGTCGAGCAGCGGAC
CGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCATTGAACGCGCGCGC
GCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACACACACACCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAA
AATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-3 Trichogramma brassicae

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----

AGCAGTGTGATACGTGCGCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-4 *Trichogramma brassicae*

-----AACATCGACATTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCT
CGTTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTC
TCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTGCGCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGCGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-5 *Trichogramma brassicae*

ATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAA
AAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGTCTC
TATCTCT-----CTTACTCTTCTTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTGCGCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNGCGCG
CGCGCGCACTTTTTTTAAACACACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAAAGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC—TGAACGAG

ALEX-6 *Trichogramma evanescens*

ATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAA
AAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGTCTC
TATCTCTATGCGCTCGCGCGCGCTCTTTCTTCTATTCGTAGAGAGAGAGAGTGC
GCGAGAGTGTGCGTAGCAGTGTGACACGTCGCCTCAAACGAAACGCAAGAAAAA
AGATGAATTCGTTTCGTCTAGCTGGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTAC-----
GTCAGTACTTCCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCTCGTGCTCTCTTTTGTTTAACGAACGAAAGTAGGTA
ACGAC-----GGCTAGCTCGAAGCTTT

ALEX-7 *Trichogramma brassicae*

-----CATTC--GACGCCATTGCGGTC-
ACGGATCTCGTTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCC
GACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
-----CTTACTCTTCTTGAAG-----CGCAGGAG-----
CAGTGTGATACGTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTTCGT
CTAGCTGGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTTCC
GATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACG----
CACACACACACCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAATTTTTGC
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGACCTCAGAAAAAGAGCGAAAGAACACA
CGTGTGAGAAAGGCTCCGGGGACTCGACGCCAGAAACGATCGGGAAGTACCGCG
CGCGAGACGAGTCTCTCAAGCGGTAAGCGCGCGCGCCAGCTAGACCGAACGA
ATTCATCTTTTTTTCTTGCCGTTTCGTTTGGAGGCGACGTATCACACGGCTCCCGGCG
CTTCGAAGAAGAGTAAGAGAGATAGAGACGAGCGCCAGATCACGCTCTCTCTG
GCGAGAGAGCAGTCGGGTTTCGTTTTTTATAAACAAACCCTCAGCCAGGCGTGGTC
CGGGGAACGAGATTCGTTGGACCGCAATGTGCGTTCGAAATGTCGATGTTTCATGT
GTCCTGCAATTCACAAAGAACATGTGTGGTCGCTGTCTGGAGAGCGACCGACAGA
CAGCTGACGAAGAGACGGACA

ALEX-8 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-9 *Trichogramma brassicae*

GACATTTAGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACGCCTGGC
TGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGA
TCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG--

AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCTCGTCGAGCAGCGGAC
CGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCAATTGAACGCGCGCGC
GCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACACACACCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAA
AATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-10 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC

GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-11 *Trichogramma brassicae*

-----AACATCGACATTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCT
CGTTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTC
TCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTGCGCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-12 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTGCGCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCTCGTCGAGCAGCGGAC
CGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTTCATTGAACGCGCGCGC
GCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACACACACACCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAA
AATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-13 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACACA--
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-14 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-15 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----

AGCAGTGTGATACGTGCGCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCTCGTCGAGCAGCGGAC
CGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCATTGAACGCGCGCGC
GCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACACACACCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAA
AATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-16 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----

CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----

AGCAGTGTGATACGTGCGCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--

GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----

CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC—

TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-17 *Trichogramma brassicae*

ATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAA
AAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGTCTC
TATCTCT-----CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----

AGCAGTGTGATACGTGCGCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCNNNNNNNNNNNNNNNN

NNCGCG
CGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----

CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--TGAACGAG

ALEX-18 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-19 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-20 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----

CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----

AGCAGTGTGATACGTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCTCGTCGAGCAGCGGAC
CGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCATTGAACGCGCGCGC
GCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACACACACCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAA
AATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-21 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----

CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----

AGCAGTGTGATACGTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCTCGTCGAGCAGCGGAC
CGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCATTGAACGCGCGCGC
GCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACACACACCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAA
AATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-23 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----

CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----

AGCAGTGTGATACGTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----

CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-25 *Trichogramma brassicae*

ATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAA
AAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAGCGTTGATCTGGGCGCTCGTCTC
TATCTCT-----CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTCTCGTCGAGCAGCGGAC
CGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCATTGAACGCGCGCGC
GCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACACACACCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAA
AATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC

ALEX-26 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCGTTT
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC

ALEX-27 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----

AGCAGTGTGATACGTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCG TTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

ALEX-28 *Trichogramma brassicae*

AACATCGACATTTTCGAACGCACATTGCGGTCCACGGATCTCGTTCCCGGACCACG
CCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAAAACGAACCCGACTGCTCTCTCGCAAGAGAGAG
CGTTGATCTGGGCGCTCGTCTCTATCTCT-----
CTTACTCTTCTTCGAAGCGCAGG-----
AGCAGTGTGATACGTCGCCTCAAACGAACGGCAAGAAAAAAGATGAATTCG TTC
GTCTAGCTGGCGCGCGCGCTTACCGCTTGGAGAGTACTCGCTCGCGCGAGTACTT
CCGATCGTTCTGCGTCGAGTCCCGGAGCTTTCTCGACTC--
GTCGAGCAGCGGACCGACGTCTAGCACACGATCAGGCTCGTCCATGCATCGGTCA
TTGAACGCGCGCGCGCGCACTTTTTTTAAACGCACACACACA----
CCGTGTGTGCGTTTATTAAGAAAAATGGCTAGCTCGAA--TTTTTGC--
TGAACGAGTCTTTTTTTCTCGATCGACGAC

PRILOG 4. Sekvence COI gena *Trichogramma* jedinki uzorkovanih u 2016. godini.

ALEX-1

GGAATTATTGGTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAG
GTTCTTTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTT
TAATAATTTTTTTTTTTGTTATAACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAA
TTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAAC
AGGAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATA
GTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAA
TTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATT
GAGTTAATTTCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTA
TCATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACT

ALEX-2

TTCTTTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTT
AATAATTTTTTTTTTTGTTATAACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAAT
TCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGAT
TTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACA
GGAECTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAG
TGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAAT
TATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATTG
AGTTAATTTCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTAT
CATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACT

ALEX-3

--
AATTATTGGTTTATCTATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTT
CTTTAATCGGAAATGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTTA
ATAATTTTTTTTTTTGTTATAACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATT
CCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATATAAGATT
TTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAG
GAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGT

GGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATT
ATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATTGA
GTTAATTTCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTGTC
ATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTA

ALEX-4

GGTTTATCTATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTCTTTAAT
CGGAAATGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAATAATTT
TTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTCCTTTAA
TATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATATAAGATTTTGATTA
TTACCTCCAAGATTAATATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGGAACTGG
AACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTGGTCCTT
CAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTATAGGTT
CAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATTGAGTTAATT
TCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTGTCATTACCA
GTTTTAGCTGGGGCAA

ALEX-5

-

GAATTATTGGTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGG
TTCTTTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTT
ATAATTTTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAAT
TCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGAT
TTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACA
GGAACCTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAG
TGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAAT
TATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATTG
AGTTAATTTCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTAT
CATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTAATTAATTTGATCGAAATTTAAAT
ACTTCTTTTTTT

ALEX-6

ATTATTGGTTTATCTATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTC
TTTAATTGGTAATGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAAT
AATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTCC
TTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGATTTT
GATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGGA
ACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTGG
TCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTAT
AGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATTGAGT
TAATTTCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTATCAT
TACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACT
TCTTTTTTT

ALEX-8

TTGGTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTCTTTA
ATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAATAATT
TTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTCCTTTA
ATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGATTTTGATT
ATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGGAACTG
GAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTGGTCCT
TCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTATAGGT
TCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATTGAGTTAAT
TTCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTATCATTACC
AGTTTTAGCTGGGGCAATTACTA

ALEX-9

GGAATTATTGGTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAG
GTTCTTTAATTGGAAATGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTT
TAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAA
TTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAAC
AGGAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATA

GTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAA
TTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATT
GAGTTAATTTCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTA
TCATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAA
TACTTCTTTTTT

ALEX-10

GGAATTATTGGTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAG
GTTCTTTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTT
TAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAA
TTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTTCTCGAATAAATAATATAAGA
TTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATCTAGAATATTTATTGGAAC
AGGAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATA
GTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAA
TTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATT
GAGTTAATTTCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTA
TCATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAA
TACTTCTTTTTT

ALEX-11

GGAATTATTGGTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAG
GTTCTTTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTT
TAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAA
TTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTTCTCGAATAAATAATATAAGA
TTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATCTAGAATATTTATTGGAAC
AGGAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATA
GTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAA
TTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATT
GAGTTAATTTCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTA
TCATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACT

ALEX-12

TTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTCTTTAATTGG

AAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAATAATTTTTTT
TTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTCCTTTAATATT
AGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTA
CCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGGAAGCTGGAA
CAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTGGTCCTTCAG
TGGATTTATCAATTTTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTATAGGTTCAA
TCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAAATTGAGTTAATTTCC
TTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTATCATTACCAGTT
TTAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATACTTCTTTTTTT

ALEX-13

GGTTCTTTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTT
TTTAATAATTTTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTT
AATTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAA
GATTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGA
ACAGGAAGCTGGAAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCA
TAGTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTC
AATTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAA
TTGAGTTAATTCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATT
ATCATTACCAGTTT

ALEX-14

TTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTCTTTAATTGG
AAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAATAATTTTTTT
TTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTCCTTTAATATT
AGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTA
CCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGGAAGCTGGAA
CAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTGGTCCTTCAG
TGGATTTATCAATTTTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTATAGGTTCAA
TCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAAATTGAGTTAATTTCC
TTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTATCATTACCAGTT
TTAGCTGGGGCAATTACT

ALEX-17

TTGGTTTATCTATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTCTTTA
ATCGGAAATGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAATAAT
TTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTCCTTT
AATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATATAAGATTTTGAT
TATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGGAACT
GGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTGGTCC
TTCAGTGGATTTATCAATTTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTATAGG
TTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATTGAGTTAA
TTTCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTGTCATTAC
CAGTTTTAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATAC

ALEX-18

ATTATTGGTTTATCTATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTCC
TTAATCGGAAATGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAA
TAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTC
CTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATATAAGATTT
TGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGG
AACTGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTG
GTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTA
TAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATTGAG
TTAATTTTCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTGTCA
TTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAATAC
TTCTTTTTT

ALEX-19

TTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTCT
TTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAAT
AATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTCC
TTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGATTTT
GATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGGA

ACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTGG
TCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTAT
AGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAAATTGAGT
TAATTTCCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTAT

ALEX-20

AAATCCAGGTTCTTTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTC
ATGCTTTTTTAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAA
ATTATTTAATTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAAT
AATATAAGATTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATT
TATTGGAACAGGAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATT
TATCTCATAGTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGG
TTTCTTCAATTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATT
TATAAAAATTGAGTTAATTTCCCTTATTTTCTTG

ALEX-21

-----CAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTCT
TTAATCGGAAATGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAAT
AATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTCC
TTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGATTTT
GATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGGA
ACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTGG
TCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTAT
AGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAAATTGAGT
TAATTTCCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTATCAT
TACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCG

ALEX-23

-----GTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAGGTTCT
TTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTTTAAT
AATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAATTCC
TTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGATTTT
GATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAACAGGA

ACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATAGTGG
TCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAATTAT
AGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAAATTGAGT
TAATTTCCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTATCAT
TACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACTA

ALEX-25

GGAATTATTGGTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAG
GTTCTTTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTT
TAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAA
TTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTTCTTCGAATAAATAATATAAGA
TTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATCTAGAATATTTATTGGAAC
AGGAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATA
GTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAA
TTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATT
GAGTTAATTTCCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTA
TCATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACT

ALEX-26

GGAATTATTGGTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAG
GTTCTTTAATTGGAAATGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTT
TAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAA
TTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTTCTTCGAATAAATAATATAAGA
TTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATCTAGAATATTTATTGGAAC
AGGAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATA
GTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAA
TTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATT
GAGTTAATTTCCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTA
TCATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACT

ALEX-27

GGAATTATTGGTTTATCTATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAG
GTTCTTTAATCGGAAATGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTT
TAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAA

TTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATATAAGA
TTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAAC
AGGAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATA
GTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAA
TTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATT
GAGTTAATTCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTG
TCATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACT

ALEX-28

GGAATTATTGGTTTATCAATAAGAATAATTATTCGTTTAGAATTAGGAAATCCAG
GTTCTTTAATTGGAAACGATCAAATTTATAATTCTATTGTTACTAGTCATGCTTTTT
TAATAATTTTTTTTTTTGTTATACCTGTTATAATAGGAGGTTTTGGAAATTATTTAA
TTCCTTTAATATTAGGAAGACCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATATAAGA
TTTTGATTATTACCTCCAAGATTAATATTATTATTATCTAGAATATTTATTGGAAC
AGGAACTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCGAATTTATCTCATA
GTGGTCCTTCAGTGGATTTATCAATTTTTCTTTACATATTGCTGGGGTTTCTTCAA
TTATAGGTTCAATCAATTTTATTACAACAATTTTAAATATAAAAATTTATAAAATT
GAGTTAATTCCTTATTTTCTTGAGCTATATTATTAACAGCAATTTTATTATTATTA
TCATTACCAGTTTTAGCTGGGGCAATTACTATATTATTATTTGATCGAAATTTAAA
TACTTCTTTTTTT

PRILOG 5. Sekvence *wsp* gena *Trichogramma* jedinki uzorkovanih u 2016.godini.

ALEX-11_ *wsp*

GATGAAGAACTAGCTACTACGTTTCGTTTACAATACAACGGTGAAATTTTACCTT
TTTATACAAAAGTTGATGGTATTA AAAAATTCAACAGGTAAAGAGGAGGATAG
TCCTTTAAAAGATCTTTTATAGCTGGTGGTTTTGCATTTGGTTATAAAATGGATG
ACATCAGAGTTGATGTTGAAGGGCTTTACTCACGATTGGCTAAAAATAAAGCTGT
AATAGATGCTTCTGAATCACATGTTGCAGACAGTTTAACAGCATTTCAGGATTG
GTTAACGTTTATTATGATATAGTGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGG
TGTTGGTGTGGTGCAGCATATATCAGCAATCCTTCAAACGCTGCTGAAGTTAAA
GATCAAAGGAGGTTTCGGTTTTGCTTATCAAGCAAAGCTGGTGTAGTTATGATG
TAGCCCCAGAAATCAAACCTTTTGCTGGAGCTCGTTACTTCGGTTCTTATGGTGCT
AGTTTTGATAAGGCAGCTAAGGGTGATGATGGTATC

ALEX-2_ *wsp*

GATGAAGAACTAGCTACTACGTTTCGTTTACAATACAACGGTGAAATTTTACCTT
TTTATACAAAAGTTGATGGTATTA AAAAATTCAACAGGTAAAGAGGAGGATAGTCC
TTTAAAAGATCTTTTATAGCTGGTGGTTTTGCATTTGGTTATAAAATGGATGACA
TCAGAGTTGATGTTGAAGGGCTTTACTCACGATTGGCTAAAAATAAAGCTGTAAT
AGATGCTTCTGAATCACATGTTGCAGACAGTTTAACAGCATTTCAGGATTGGTT
AACGTTTATTATGATATAGTGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGT
TGGTGTGGTGCAGCATATATCAGCAATCCTTCAAACGCTGCTGAAGTTAAAGAT
CAAAGGAGGTTTCGGTTTTGCTTATCAAGCAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAG
CCCCAGAAATCAAACCTTTTGCTGGAGCTCGTTACTTCGGTTCTTATGGTGCTAGT
TTTGATAAGGCAGCTAAGGGTGATGATGGTATC

BIOGRAFIJA

Diplomirani inženjer poljoprivrede i Diplomirani inženjer za upravljanje tehničkim sistemima-master Aleksandar Ivezić je u trenutnom je statusu studenta doktorskih studija sa svim položenim ispitima i prijavljenom doktorskom tezom. Rođen je 14.04.1983. u Hrvatskoj, mesto Vukovar. Osnovnu školu i Gimnaziju društvenog smera završio je u Kikindi odličnim uspehom. Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, smer Zaštita bilja, upisao je školske 2001/2002 godine. Osnovne studije je završio je sa prosečnom ocenom 8.36. Diplomski rad je odbranio u junu 2007. godine pod mentorstvom Prof. dr Branka Konstatinović na predmetu Herbologija na temu „Rezistentnost običnog štira (*Amaranthus retroflexus*) na sulfoniluree“ sa ocenom 10.

Školske 2007/2008.godine upisao je Master akademske studije na Tehničkom fakultetu „Mihajlo Pupin“ u Zrenjaninu, Univerzitet u Novom Sadu, studijski program Upravljanje tehničkim sistemima, a završio 2009. godine sa prosečnom ocenom 8.27. Master rad pod naslovom „Tehnološki projekat toplotne stanice snage 27 MW” je uspešno odbranio u novembru 2009.god.sa ocenom 10.

Kandidat je zaposlen od 2009. godine u Poljoprivrednoj stručnoj službi u Kikindi kao stručni saradnik za zaštitu bilja i obavlja poslove zdravstvene kontrole semenskih useva i sadnog materijala, vrši fitosanitarne preglede poljoprivrednih proizvoda biljnog porekla i izdaje fitosanitarna uverenja, radi na poslovima ispitivanja semena poljoprivrednog bilja i merkantilnih proizvoda biljnog porekla i utvrđuje zdravstveno stanje semena i sadnog materijala, postavlja ogledne sa sredstvima za zaštitu bilja, obrađuje podatke, sačinjava izveštaje i aktivno učestvuje u prezentovanju dobijenih rezultata. Kandidat je od 2011. godine uključen u projekat pod nazivom “Prognozno-izveštajna služba Srbije”. Projekat je pokrenut od strane Pokrajinskog sekretarijata za poljoprivredu, vodoprivredu i šumarstvo u cilju praćenja ekonomski najznačajnijih ratarskih, povrtarskih i voćarskih štetočina i patogena. U okviru pomenutog projekta, kandidat učestvuje u organizovanju i koordinisanju rada prognozno –izveštajnih poslova i svih saradnika koji učestvuju u realizaciji tih poslova na nivou operativnog područnog centra RC Kikinda. Kao izvršilac prognozno-izveštajnih poslova kandidat proverava verodostojnost prikupljenih podataka, analizira i obrađuje prikupljene podatke sa osmatračkih punktova, priprema pismena i usmena saopštenja o kretanju štetnih organizama i izveštava krajnje korisnike putem sredstava javnog informisanja

(lokalne novine, radio i TV, Portal PSS -www.pissrbija.com i SMS poruke) o rezultatima praćenja istih za lokalni nivo.

Dosadašnja interesovanja i aktivnosti kandidata M.Sc. Aleksandar Ivezić usmerena su ka entomologiji sa fokusom na monitoring, nadzor i suzbijanje ekonomski najznačajnijih štetnih insekata na teritoriji Srbije. Tokom doktorskih studija kandidat je svoj istraživački rad prvenstveno usmerio ka integralnoj zaštiti bilja i biološkoj kontroli poljoprivrednih štetočina i proučavanju korisnih insekata prisutnih na teritoriji Srbije. Tekuće istraživačke aktivnosti se prvenstveno odnose na inventarizaciju parazitnih osica iz roda *Trichogramma* na teritoriji Srbije sa ciljem uvođenja ovih korisnih insekata u procese zaštite bilja i njihovu komercijalnu primenu. Dosadašnje istraživačke aktivnosti kandidata na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, na Departmanu za fitomedicinu i zaštitu životne sredine odvijale su se pod mentorstvom Prof. dr Aleksandre Ignjatović-Ćupina.

Učesnik je međunarodnog trening kursa pod nazivom “Organic Production of Field Crops, The Export Possibility of Organic Products to the EU Market” u organizaciji Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH (Subotica, 2014), kao i brojnih obuka/edukacija u organizaciji institucija iz zemlje i inostranstva (“Odnosi sa medijima i javnim nastupima” Pokrajinski centar za edukaciju, Poljoprivredna stanica doo, Novi Sad 2010; “Osnovi organske proizvodnje”, Nacionalno udruženje za razvoj organske proizvodnje, Beograd 2010; obuka za predavača “Bezbedna primena pesticide i zaštita životne sredine”, Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede, Beograd 2011; “Predavačke veštine i komunikacija”, United States Agency International Development (USAID), Beograd 2011; “Edukacija za savremene tehnologije u zaštiti bilja 2 i 3-Integralna proizvodnja paradajza i luka”, Institut za primenu nauke u poljoprivredi, Beograd 2011; “Edukacija za farm menadžment”, Institut za primenu nauke u poljoprivredi, Beograd 2012; “Edukacija za savremene tehnologije u zaštiti bilja-Integralna zaštita mrkve i paprika”, Institut za primenu nauke u poljoprivredi, Beograd 2012; “Edukacija za savetodavne veštine”, Institut za primenu nauke u poljoprivredi, Beograd 2013).

Učesnik je dve međunarodne konferencije: “Biological Management of Arthropod Pest in Greenhouse Crops: Principles and their Application”(COST akcija, Rehovot, Israel 2015) i “State-of-the-arte technologies: challenge for the research in Agricultural and Food Sciences”, Belgrade, Serbia 2016 (Projekat AREA, FP7) kao i brojnih simpozijuma o zaštiti bilja u organizaciji Društva za zaštitu bilja Srbije i Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu iz Beograd.

Učestvovao je u dve naučno istraživačke misije: u Sjedinjenim Američkim Državama u 2017 godini (University of California, Riverside, Department for Entomology), gde je kao gost kod profesora Richard Stouthamer obučen za primenu molekularnih metoda za identifikaciju insekata i patogena i Francuskoju 2018. godini (COST akcija “Characterisation of endosymbionts of the biological control agents *Trichogramma* wasps from Serbia and France”) u organizaciji INRA- The French National Institute for Agricultural Research, Sophia Antipolis, France, gde je uz iskustvo renomiranih eksperata na polju molekularne genetike usavršio tehnike molekularne identifikacije organizama. Ukupno je objavio 3 naučna rada od čega 1 u časopisima od međunarodnog značaja (kategorija M23, gde je prvi autor). Član je Društva za zaštitu bilja Srbije. Aleksandar Ivezić tečno govori, čita i piše engleski jezik. Stanuje u Kikindi.