

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.07.2017 године, прихваћен је извештај ментора др Милане Митровић и проф др Жељка Томановића о урађеној докторској дисертацији **Aiman M. Jamhour**, под насловом „Молекуларна карактеризација и филогенетски односи европских врста рода *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)“ -- “**Molecular characterization and phylogenetic relationships among European *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)**“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Милана Митровић, виши научни сарадник Института за заштиту биља и животну средину у Београду, проф. др Жељко Томановић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Анђелко Петровић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

Докторска дисертација Aiman M. Jamhour, под насловом „Молекуларна карактеризација и филогенетски односи европских врста рода *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)“ - “Molecular characterization and phylogenetic relationships among European *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)“ написана је на 105 страна, садржи 18 слика и 26 табела. Текст дисертације је подељен у 9 основних поглавља: Увод (Introduction - 14 страна), Циљеви истраживања (The main objectives – 1 страна), Материјал и методе (Material and methods - 12 страна), Резултати (Results - 36 страна), Дискусија (Discussion - 15 страна), Закључци (Conclusions - 3 стране), Литература (References - 16 страна), Прилог 1 (Appendix 1 - 7 страна) и Прилог 2 (Appendix 2 - 1 страна). Рад садржи 192 литературна цитата, Садржај (Content), као и Сажетак на српском и Abstract на енглеском језику.

АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Поглавље **Introduction/Увод** докторске дисертације садржи шест потпоглавља у којима се систематично и разумљиво представљају досадашња литературна сазнања из области од значаја за докторску дисертацију. У потпоглављу **General introduction to the subfamily Aphidiinae and its economic importance** описује се подфамилија Aphidiinae, дистрибуција врста и облигаторни ендопаразитизам. Дат је опис животног циклуса паразитоида и специфичности према домаћину, од монофагности до генералиста. Истакнут је и економски значај ове подфамилије као природних непријатеља који се примењују у биолошкој контроли биљних ваши. Као најзначајнији агенти у биолошкој контроли наводе се врсте родова *Aphidius*, *Diaeretiella*, *Ephedrus* и *Praon*. Паразитоди су оцењени као ефикасни регулатори бројности популација ваши и као такви су нашли широку примену у заштити усева на отвореном пољу, као и култура у стакленицима. У потпоглављу **Biological traits, modes of reproduction and host-associated behaviour of**

Aphidiinae описује се биологија врста, од овипозиције до излетања одраслих јединки из мумија. Помиње се и модел сексуалног (архенотокија) и асексуалног (телитокија) размножавања код подфамилије *Aphidiinae*, са описом сваког механизма репродукције. Приказано је шест различитих типова понашања женки приликом избора одговарајућег домаћина. Наведено је пет корака који се могу десити независно, или пак преклопити приликом проналажења и одабира одговарајућег домаћина за полагање јаја и развића. У потпоглављу *Molecular tools in taxonomy of parasitoids* пореде се литературни подаци о таксономији подфамилије *Aphidiinae*, проблематици у проналажењу стабилних морфолошких карактера за њихову детерминацију, као и значај молекуларних маркера у разрешењу ових проблема. Описује се када су почеле да се развијају молекуларне методе и њихов значај како за фундаментална, тако и за примењена истраживања. Истиче се да су молекуларне методе брзо нашле примену и у таксономији, популациој генетици и филогенетским студијама паразитоида. Наводе се једарни маркери и информативност у детерминацији виших таксона, уз приказане примере примењених једарних региона рибозомалне RNK који имају више копија, као што су 18S, 5.8S, 28S, ITS1, ITS2 и др. Такође се помињу и једарни гени са једном копијом и њихове карактеристике и значај, као што је фактор елонгације 1- α који је кодирајући ген укључен у GTP-зависно везивање транспортне tRNK током транслације. Овај ген је користан за утврђивање скорашњег раздвајања популација због присутних брзо еволуирајућих интрона. У овом потпоглављу дат је преглед најзначајнијих гена митохондријске ДНК, као што су 16S rRNK, 12S RNK, цитохром б, цитохром оксидаза субјединица 1 и 2, ATP6-аза, ND3, ATP8-аза и др. и истакнут њихов значај у таксономским студијама због високе стопе варијабилности и механизма наслеђивања. Описан је метод ДНК баркодинга и поменути аутори који су предложили примену овог фрагмента митохондријске ДНК који кодира цитохром оксидазу субјединица 1 у идентификацији врста и како је формиран конзорцијум који је усвојио овај ген као метод избора у истраживањима диверзитета животиња. Истакнут је значај ДНК баркодинга у фундаменталним и примењеним истраживањима и наведени примери примене овог гена у филогенетским анализама различитих врста паразитоида из подфамилије *Aphidiinae* и детерминацији криптичких таксона у оквиру комплекса врста. У потпоглављу *Systematics and phylogeny of the Aphidiinae* наведени су примери класификације подфамилије *Aphidiinae* засноване на морфолошким карактеристикама, и који су то најзначајнији карактери који се користе у идентификацији врста. Наводе се студије које су супротстављене у мишљењима о статусу таксона *Aphidiinae* као фамилије или пак подфамилије у оквиру фамилије Braconidae. Такође су наведени и подаци различитих аутора о класификацији трибуса у оквиру подфамилије *Aphidiinae* и да ли имају парафилетичко или монофилетичко порекло. Потпоглавље *General information, economic importance and biological traits of Aphidius species* садржи основне податке о броју врста, ареалу распрострањења, економском значају као биолошких агената за сузбијање биљних вашију на отвореним пољима и у стакленицима. Наводе се примери врста рода *Aphidius*, као што су *A. ervi*, *A. eadyi*, *A. smithi*, *A. rhopalosiphii*, *A. colemani*, *A. matricariae* који су дали значајне резултате у регулисању бројности неких од економски значајних врста ваши у региону где су интродуковани као природни непријатељи. Такође је у овом потпоглављу дат опис животног циклуса, сексуално размножавање, модел понашања приликом проналажења одговарајућег домаћина за овипозицију и развиће и др. У потпоглављу *Taxonomic status of different Aphidius species* приказана је класификација рода *Aphidius*, филогенетски односи са другим родовима и дискусија на тему парафилетичког или монофилетичког порекла врста. Наведени су примери ревизије статуса рода *Lysaphidius* и *Euaphidius* и ре-дескрипције као подродова унутар рода *Aphidius*. У овом делу се наводе морфолошки карактери који се најчешће користе у кључевима за детерминацију врста рода *Aphidius*, и дискутује о таксономским

проблемима код ове групе паразитоида. Истиче се значај тачне идентификације паразитоида, првенствено потенцијалних биолошких агената који можда представљају криптичке врсте које се не могу разликовати на основу морфолошких карактера, али молекуларне анализе и биологија свакако указују на постојање истих. Помињу се литературни извори који су се бавили проблемом таксономског статуса врста *A. colemani*, *A. platensis* и *A. transcaspicus*, односно *A. ervi*, *A. microlophii* и *A. pisivorus*.

У поглављу **Main objectives/Циљеви истраживања** изнети су општи циљеви докторске дисертације који обухватају молекуларну карактеризацију и утврђивање генетичке дивергенције паразитоида из рода *Aphidius* пореклом из Европе у асоцијацији са различитим врстама ваши и биљака домаћина, истраживање потенцијалних криптичких таксона, поређење молекуларних података са морфолошким карактеристикама на основу којих се врсте рода *Aphidius* идентификују, истраживање филогенетских односа врста рода *Aphidius* и утврђивање филетичких група које до сада нису биле познате.

Поглавље **Material and methods/Материјал и методе** садржи укупно четири потпоглавља. У потпоглављу **Sampling the insect material** наведено је да су 33 врсте паразитоида анализирани и да материјал води порекло из 15 земаља: Белгије, Ирана, Немачке, Чешке, Хрватске, Црне Горе, Србије, Словеније, Бугарске, Јапана, Грчке, Литваније, Малте, Швајцарске и Шведске. Поред свеже сакупљеног материјала, анализирани су и суви примерци из ентомолошких збирки. У Табели 1 су приказани подаци о локалитетима, асоцијацијама са биљним вашим и биљкама са којих су паразитоиди сакупљени, а у Табели 2 референтни материјал који је коришћен за филогенетске анализе. У потпоглављу **DNA extraction** дескриптивно је приказан метод не-инвазивне екстракције ДНК из инсеката коришћењем кита за екстракцију којим се чувају примерци за накнадна испитивања. У потпоглављу **PCR amplification and sequencing** описан је протокол и универзални прајмери за умножавање баркодинг региона гена који кодира цитохром оксидазу субјединица 1 митохондријске ДНК. Специјално за умножавање кратких фрагмената баркодинг региона код сувих примерака врста рода *Aphidius*, дизајнирани су дегенерисани прајмери и развијени су PCR протоколи за умножавање кратких фрагмената. У овом потпоглављу приказани су и PCR протокол и прајмери за умножавање једарног гена за фактор елонгације 1 алфа (Elongation factor 1- α). У потпоглављу **Data analyses** објашњено је како се читавају секвенце, пореде и анализирају. Наведени су програмски пакети, као и статистички модели за поређење секвенци и израду филогенетских стабала. Наведен је и метод утврђивања информативности баркодинг региона митохондријске ДНК у идентификацији врста рода *Aphidius*.

Поглавље **Results/Резултати** подељено је на укупно 34 потпоглавља. У потпоглављу **PCR amplification and sequencing of barcoding region of the COI mitochondrial gene and elongation factor 1- α nuclear gene** наводи се успешност умножавања митохондријског и једарног гена. У потпоглављу ***Aphidius urticae* s. str., *A. rubi*, *A. silvaticus*** приказана је молекуларна карактеризација популација идентификованих да припадају групи *Aphidius urticae* у асоцијацији са различитим врстама биљних ваши са неколико локалитета. Анализе митондријског маркера су показале јасно раздвајање три врсте у асоцијацији са различитим домаћинима. Крајњи резултат упоредне анализе морфолошких и молекуларних података је поновни опис врста које су до тада биле синонимизирани, тј. популације које се развијају на *Aulacorthum vaccinii* и *Macrosiphum funestum* су поново описане као *A. rubi*, популације које паразитирају *Microlophium carnosum* као *Aphidius urticae* и врста која се развија на *Amphorophora rubi* као *A. silvaticus*. Баркодинг регион митохондријске ДНК је оцењен као поуздан маркер у раздвајању ових врста. Генетичке дистанце су износиле од 2% између *A. rubi* и *A. urticae* до 8,3-8,9% између *A. silvaticus* и претходне две врсте. Детаљан морфолошки опис *A. rubi* и *A.*

silvaticus је приказан накнадно у потпоглављу Appendix 1. У потпоглављу *Aphidius matricariae* наведени су резултати поређења секвенци баркодинг региона код примерака ове врсте са различитих домаћина. Утврђена су два баркодинг хаплотипа која се разликују 0,3%. У односу на остале конгенеричке врсте, *A. matricariae* је на основу митохондријског маркера најближа врсти *A. urticae*, од које се разликује од 0,7 до 1,4%. Поређењем максималне интра-специјске са минималном интер-специјском дивергенцијом, утврђено је да је баркодинг маркер информативан и раздваја *A. matricariae* и *A. urticae* као засебне врсте. С друге стране, поређењем укупно две секвенце гена EF1- α за сваку врсту, утврђено је да *A. matricariae* и *A. urticae* деле исти једарни хаплотип. У потпоглављу *Aphidius absinthii* анализирани су примерци ове врсте са различитих домаћина пореклом из Хрватске, Србије, Црне Горе, Белгије и Малте. Утврђено је осам митохондријских хаплотипова који се разликују од 0,3 до 1,2%. Статистичка анализа показала је јасно груписање баркодинг хаплотипова *A. absinthii* уз један до четири мутацијска корака који их повезују. У потпоглављу *Aphidius funebris* се наводе резултати молекуларне карактеризације баркодинг региона код 16 примерака ове врсте пореклом из Србије са различитих асоцијација ваш/биљка домаћин. Упоредном анализом секвенци детерминисана су четири баркодинг хаплотипа који се разликују од 0,2 до 1,6%. У потпоглављу *Aphidius tanacetarius* анализирано је седам секвенци пореклом из Србије и Белгије са исте асоцијације *Metopeurum fuscoviridae/ Tanacetum vulgare*. Утврђена су два баркодинг хаплотипа који се разликују у нуклеотидном саставу секвенци за 0,5%. Све мутације су биле синонимног карактера и нису довеле до промена у аминокиселинама које кодирају. Упаривање са осталим конгенеричним врстама показало је да су врсте *A. funebris*, *A. tanacetarius* и *A. absinthii* блиске и да се не могу разликовати на основу митохондријског маркера, групишући се заједно на филогенетском стаблу и *median joining* мрежи. Баркодинг хаплотипови ове три врсте се разликују од 0,2-1,6%, при чему *A. absinthii* дели један хаплотип са *A. tanacetarius*, и други са *A. funebris*. Максимална интра-специјска стопа дивергенције је већа од минималне интер-специјске дистанце код ове три врсте. Поређење секвенци једарног гена је утврдило пет хаплотипова који се разликују од 0,2 до 0,8%, с тим да врсте *A. tanacetarius* и *A. funebris* деле исти EF1- α хаплотип. Све промене на једарном гену су синонимне природе и не резултирају у промени аминокиселина у протеину. У потпоглављу *Aphidius microlophii* наводе се резултати поређења баркодинг секвенци три примерка ове врсте пореклом из Белгије који паразитирају ваши на коприви. Све три секвенце су идентичне и припадају истом митохондријском хаплотипу. Потпоглавље *Aphidius ervi* садржи резултате поређења баркодинг секвенци примерака ове врсте са асоцијација *Sitobion avenae/Triticum aestivum* и *Acyrtosiphon pisum/Medicago sativa*. Све секвенце су идентичне и деле исти хаплотип. Упаривање секвенци са осталим конгенеричним врстама утврдило је да су баркодинг хаплотипови *A. microlophii* и *A. ervi* идентични. Додатно умножени и секвенцирани ген EF1- α показао је да ове две врсте деле такође и један исти једарни хаплотип. У потпоглављу *Aphidius hieraciorum* су наведени резултати молекуларне карактеризације код примерака који паразитирају *Nasonovia ribisnigri* на различитим биљкама домаћинима, сакупљеним у Србији и Шведској. Поређењем баркодинг секвенци утврђено је да су све идентичне и припадају истом митохондријском хаплотипу. Упаривањем хаплотипа *A. hieraciorum* са осталим европским врстама рода *Aphidius*, констатовано је да су еволутивне дистанце најмање у односу на баркодинг хаплотип који деле врсте *A. ervi* и *A. microlophii* (1,9%). Применом калкулације максималне парсимоније, утврђено је да се *A. hieraciorum* јасно издваја од друге две врсте, као и да су повезане са најмање 15 мутацијских корака, али и три вектора који указују на недостајуће интермедијарне хаплотипове који нису узорковани или су искорењени. На крају је умножен и секвенциран нуклеарни ген и разлика у EF1- α секвенцама између *A. hieraciorum*, *A. ervi* и *A. microlophii* је 0,5%.

Потпоглавље *Aphidius banksae* садржи резултате поређења баркодинг секвенци примерака пореклом из Србије и Црне Горе, са различитих асоцијација ваш/биљка домаћин. Укупно три митохондријска хаплотипа су утврђена код *A. banksae* са 10 варијабилних места у нуклеотидном саставу секвенци (дистанце 0,2 – 1,7%). У квалитативном смислу, све мутације су биле синонимног карактера и нису резултирале у промени аминокиселина. У потпоглављу *Aphidius rhopalosiphi* приказана је молекуларна карактеризација митохондријског маркера код примерака сакупљених у асоцијацији са *Rhopalosiphum nymphaeae/Typha latifolia*. Укупно два баркодинг хаплотипа су утврђена са стопом дивергенције од 1,4%. Од осам мутација које су детектоване, седам су биле синонимне док је само једна произвела промену у аминокиселинском саставу протеина. Поређење са осталим конгенеричним врстама показало је да је *A. rhopalosiphi* најсроднији са *A. rubi*, са генетичким дистанцама од 0,7 до 1,2% између баркодинг хаплотипова. На филогенетском стаблу, као и на мрежи заснованој на калкулацији максималне парсимоније, *A. rubi* се позиционирала међу секвенце *A. rhopalosiphi*, указујући јасно да се на основу баркодинг секвенци ове две врсте не могу разликовати. С друге стране, карактеризација једарног гена код ове две врсте показала је да се њихове EF1- α секвенце разликују за 0,6%. У потпоглављу *Aphidius salicis* описују се анализе 12 секвенци баркодинг региона митохондријске ДНК. Утврђено је седам промена у нуклеотидном саставу, с тим да због синонимног карактера нису довеле до промена у протеинском саставу који кодирају. Укупно пет баркодинг хаплотипова је детектовано, са дистанцама од 0,2 до 1%. У потпоглављу *Aphidius aquilus* укупно три примерка су анализирана који су сакупљени у Србији са домаћина *Betulaphis quadrituberculata* која је у асоцијацији са биљком *Betula* sp. Све три секвенце су биле исте и припадају истом баркодинг хаплотипу. Упаривање са другим врстама установило је врло мале еволутивне дистанце између митохондријских хаплотипова *A. aquilus* и *A. salicis*. Баркодинг регион COI гена није поуздан маркер за раздвајање ових врста. Интервал дистанци између хаплотипова ове две врсте се кретао од 0.5 до 1%. *Median joining* мрежа конструисана са баркодинг хаплотиповима потврђује да се ове две врсте групишу заједно без јасног раздвајања као засебних ентитета. На основу једарног маркера такође нема јасне дискриминације врста јер су им секвенце фактора елонгације 1- α идентичне. Потпоглавље *Aphidius rosae* приказује карактеризацију баркодинг региона код десет примерака ове врсте. Три хаплотипа су утврђена, са четири варијабилна места синонимног карактера. Интервал еволутивних дистанци између хаплотипова *A. rosae* се кретао од 0,2 до 0,7%. У потпоглављу *Aphidius eadyi* анализа шест баркодинг секвенци је утврдила два хаплотипа. Њиховим поређењем детектовано је пет нуклеотидних промена, синонимног карактера, а стопа дивергенције износила је 0,9%. Потпоглавље *Aphidius (Lysaphidus) viaticus* садржи резултате поређења секвенци митохондријалног маркера код шест примерака паразитоида сакупљених са *Pleotrichophorus filaginis* у асоцијацији са *Filago germanica*. Укупно два баркодинг хаплотипа су утврђена која се разликују у само једној нуклеотидној промени синонимног карактера. У потпоглављу *Aphidius ribis* урађена је карактеризација и поређење баркодинг региона пет примерака. Укупно три хаплотипа су установљена са стопом дивергенције у интервалу од 0,2 до 0,7%. Укупно четири мутације су идентификоване, али без промена аминокиселина. У потпоглављу *Aphidius chaetosiphonis* анализиран је само један примерак сакупљен у Црној Гори са *Chaetosiphon* sp./*Potentilla clusiana* асоцијације, а који је био доступан за анализе и чијој секвенци је додељен одговарајући хаплотип који је даље упарен са осталим врстама и укључен у филогенетске анализе. У потпоглављу *Aphidius hortensis* анализирана је дивергенција митохондријалног гена код шест примерака овог паразитоида. Утврђено је постојање четири хаплотипа, са стопом дивергенције која је варијирала од 0,2 до 0,7%. Укупно четири промене су забележене у нуклеотидном саставу баркодинг секвенци, а у квалитативном

смислу све су биле синонимног карактера. Поређењем са осталим врстама рода *Aphidius*, хаплотипови *A. hortensis* (АН1-АН4) су најсроднији са хаплотипом *A. chaetosiphonis* (АСН1). Еволутивне дистанце између врста су се кретале испод 1%. Поређењем максималне интра-специјске и минималне интер-специјске дивергенције, закључује се да се ове две врсте не могу разликовати искључиво на основу баркодинг региона. *Median joining* мрежа показује да нема јасног раздвајања врста, већ је хаплотип *A. chaetosiphonis* груписан заједно са хаплотиповима *A. hortensis* и повезан са два мутацијска корака и једним медијалним вектором. Једарни маркер такође није информативан за раздвајање ових врста јер су им EF1- α секвенце идентичне. У потпоглављима *Aphidius (Lysaphidus) erysimi*, *Aphidius sonchi*, *Aphidius asterias*, *Aphidius linoaphis*, *Aphidius schimitscheki*, *Aphidius balcanicus*, *Aphidius phalangomyzi*, *Aphidius avenae*, *Aphidius sussi*, *Aphidius ericaphidis*, *Aphidius (Euaphidius) setiger*, *Aphidius uzbekistanicus*, *Aphidius (Lysaphidus) arvensis* приказано је да свака од врста има по један идентификован митохондријски хаплотип који су коришћени у реконструкцији филогенетског стабла свих анализираних европских врста рода *Aphidius* које је приказано у потпоглављу *Phylogenetic analyses of Aphidius species*. У овом потпоглављу је јасно приказано да је род *Aphidius* парафилетички и да постоји неколико удаљених монофилетичких група. На основу позиционирања врста на филогенетском стаблу потврђена је исправност ревизије статуса родова *Euaphidius* и *Lysaphidus*. У потпоглављу *Suitability of using the barcoding region of COI mtDNA in identification of Aphidius species* приказани су резултати упаривања свих врста једне са другом, на основу кога је потврђено да је баркодинг регион митохондријске ДНК валидан маркер у идентификацији већине анализираних европских врста рода *Aphidius* код којих је забележено да су максималне интра-специјске стопе дивергенције мање од минималних интер-специјских дистанци. Митохондријски ген није био информативан у раздвајању врста *A. salicis* и *A. aquilus*, *A. funebris*, *A. tanacetarius* и *A. absinthii*, *A. ervi* и *A. microlophii*, *A. chaetosiphonis* и *A. hortensis*, *A. rubi* и *A. rhopalosiphii*.

Поглавље *Discussion/Дискусија* представља анализу оригиналних резултата докторске дисертације и поређење са сазнањима других референтних аутора из те области. У првом делу се дискутује о парафилетичком пореклу рода *Aphidius* на које анализа филогенетских односа европских врста указује, са навођењем како је род *Aphidius* и трибус *Aphidiini* класификован од стране различитих аутора на основу морфолошких карактера или молекуларних анализа. Наглашено је да су истраживања у овој студији потврдила исправност ревизије статуса родова *Lysaphidus* и *Euaphidius* и њихове класификације у оквиру рода *Aphidius*. Молекуларна карактеризација баркодинг региона гена цитохром оксидазе субјединица 1 код 33 европске врсте рода *Aphidius* узоркованих са широког ареала и у асоцијацији са различитим вашим и биљкама домаћинима, показала је да је митохондријски маркер успешан у раздвајању врста. Укупно 22 врсте се успешно могу идентификовати на основу баркодинг региона. Код преосталих пет група врста утврђено је да се не могу раздвојити на основу овог маркера, јер су максималне интра-специјске веће од минималних интер-специјских дистанци. Дискутује се о резултатима молекуларне карактеризације баркодинг региона у оквиру *A. urticae* s. str. групе. Истакнуто је да су утврђене значајне еволутивне дистанце између популација у асоцијацији са различитим домаћинима. Финално је урађен поновни опис врста *A. silvaticus* и *A. rubi*, које су претходно синонимизирани као *A. urticae*. У случају *Aphidius rubi* утврђен је шири круг домаћина (*Aulacorthum* spp. и *Macrosiphum* spp.), док *A. silvaticus* паразитира *Amphorophora* spp. Састављен је и нови кључ за детерминацију *A. urticae*, *A. silvaticus* и *A. rubi*. Као резултат ове тезе истиче се и први налаз врсте *A. ericaphidis* у Европи која паразитира ваш *Ericaphis scammelli* на *Vaccinium corymbosum*, као и значај овог налаза с аспекта растуће трговине садног материјала боровнице и ширења штетних организама који се између осталог могу контролисати и природним

непријатељима као што су паразитоиди. Сматра се да је *A. ericaphidis* случајно унешен са садним материјалом и да је можда ово прва потврда, али да је врста вероватно дуже време присутна и распотраћена у Европи. Иако су дистанце у баркодинг хаплотиповима код врста *A. matricariae* и *A. urticae* биле испод 2% која се сматра граничном за раздвајање врста, опет се на основу овог маркера могу раздвојити ове морфолошки и биолошки јасно различите врсте паразитоида. Резултати ове дисертације у сагласности су са другим ауторима у указивању да код *A. matricariae* и *A. urticae* постоји тенденција интра-специјске дивергенције под утицајем различитих домаћина и географске структурираности популација. Наводи се да је *A. microlophii* иницијално описана као врста која води порекло од *A. ervi* чије популације су уско специјализоване да паразитирају ваш *Microlophium carnosum* која се храни на коприви, док *A. ervi* паразитира *Acyrtosiphon pisum*. Сматра се да постоји пре-зиготна репродуктивна изолација јер женке селективно бирају домаћине за овипозицију и развиће. Врсте *A. microlophii* и *A. ervi* нису могле да се раздвоје нити митохондријским нити једарним маркером, чиме је ова студија у сагласности са претходним публикацијама у којима су добијени исти резултати на основу анализе различитих маркера. Истакнуто је да једнаки баркодинг региони не представљају таксономски проблем, већ указују на могућу хибридизацију и интрогресију између блиско сродних врста. Ниједан од анализираних маркера није препознао *A. aquilus* нити *A. salicis* као засебне врсте. У опису врста, наведено је да је *A. aquilus* морфолошки сличан *A. salicis*. Мале дистанце између баркодинг хаплотипова и идентичне секвенце једарних гена указују да размена гена постоји и намеће потребу да се ревидира статус ових врста, узимајући у обзир морфологију, биологију и молекуларну карактеризацију. Значајан налаз у овој студији, за који нема претходних саопштења, је да се на основу митохондријског и нуклеарног маркера не могу разликовати *A. chaetosiphonis* и *A. hortensis* као засебне врсте. Обе врсте су уско специјализоване да паразитирају филогенетски различите домаћине, међутим резултати молекуларних анализа указују на размену гена између паразитоида. Не треба искључити могућност да су мале еволутивне дистанце резултат интрогресије митохондријске ДНК или да је дошло до промене у монофагности код *A. hortensis* односно *A. chaetosiphonis*. У делу дискусије помиње се и немогућност разликовања *A. absinthii*, *A. tanacetarius* и *A. funebris* као различитих врста, јер се групишу заједно, чак и деле митохондријске и једарне хаплотипове. Истакнуто је да је група аутора указала на недостатке стабилних морфолошких карактера за њихово јасно раздвајање, што су молекуларне анализе и потврдиле. Наводе се и мишљења других аутора о специјализацији паразитоида на филогенетски блиске врсте вашију. Дискутује се и о томе колико је таква специјализација подржана диференцијацијом у понашању, физиологији, морфологији и сл. Из дискусије се види да је врста *A. rhopalosiphi* значајан биолошки агент у контроли ваши на житарицама и да је била предмет многих истраживања. Према првобитној класификацији *A. rhopalosiphi* је приказана као нејасно дефинисана врста слична *A. urticae*, *A. uzbekistanicus* or *A. equiseticola*. Такође су неке студије показале да је *A. rhopalosiphi* уствари полиморфна група популација, али без јасних морфолошких и биномијских карактеристика за њихово раздвајање. Ова врста се у тестовима различитих аутора показала способном да прелази с једног домаћина на други, како у лабораторији, тако и у пољу. Такође се наводе радови у којима су молекуларне анализе утврдиле диверзитет баркодинг хаплотипова у оквиру *A. rhopalosiphi*, чак и морфолошку диференцијацију популација која се развијају на асоцијацији *Typha* sp./*Schizaphis scirpi*. Морфолошка и генетичка диференцијација у оквиру *A. rhopalosiphi* указује на могућу специјализацију на одређене домаћине и специјацију путем адаптивне дивергенције. У дискусији се наводе нека од могућих објашњења за груписање врсте *A. rubi* на основу баркодинг региона заједно са *A. rhopalosiphi*, а да се с друге стране ове две врсте јасно разликују на основу једарног маркера. На крају дискусије помињу се најчешћи механизми

специјације код паразитоида из подфамилије Aphidiinae, односно који су то процеси који ограничавају размену гена и доводе до дивергенције независних линија. Наводи се и шта све дефинише круг домаћина паразитоида и које све адаптације повлачи за собом специјализација према одређеном домаћину. Истакнут је значај дефинисања круга домаћина паразитоида због њихове примене у биолошкој контроли економски значајних ваши у агроекосистемима. Две ствари се издвајају као значајне при дефинисању ефиканости потенцијалног агента. Прво, неопходно је проверити да ли дати паразитоид представља групу криптичких таксона специјализованих на различите домаћине. Друго, да ли ће потенцијални биолошки агент након интродукције испољити полифагност у одсуству циљног штетног организма и развијати на другим врстама домаћина. У делу дискусије око значаја увођења молекуларних метода у детерминацију и класификацију паразитоида, наводе се примери успешног разоткривања криптичких уско специфичних таксона у оквиру врста које су сматране олигофагним. Такође се истиче и да молекуларне анализе не могу одговорити на све захтеве таксономије и да треба да буду додатни метод у дефинисању врста. Поред тога, наводи се значај комбиновања више маркера, једарних и митохондријских у молекуларној карактеризацији популација. Код таксономски проблематичних група, као што су паразитоиди из рода *Aphidius*, неопходно је да се пре коришћења баркодинг региона у класификацији, испита да ли је дошло до интрогресије митохондријске ДНК код сестринских врста које могу довести до погрешних закључака. На основу досадашњих таксономских истраживања и ове студије, баркодинг фрагмент митохондријске ДНК се може сматрати информативним и поузданим у класификацији врста само у комбинацији са морфометријом и био-еколошким истраживањима, тј. у интегративном приступу решавању питања статуса таксона.

У поглављу **Conclusions /Закључци** јасно и сажето су изнети најважнији закључци засновани на анализама из ове студије. Закључено је да је баркодинг регион гена митохондријске ДНК поуздан маркер у идентификацији већине анализираних врста. Једарни ген је исувише конзервативан да би био информативан у раздвајању врста. Нови дизајнирани прајмери и PCR протокол за умножавање кратких фрагмената митохондријске ДНК су се показали успешним код свих сувих примерака различитих врста рода *Aphidius*. Спајањем кратких фрагмената добијене су целе секвенце баркодинг региона које су коришћене у анализама. Филогенетске анализе баркодинг региона су показале да је род *Aphidius* уствари парафилетичка група састављена из неколико јасно дефинисаних монофилетичких група. Филогенетско стабло показало је раздвајање 22 врсте као засебних ентитета: *A. erysimi*, *A. sonchi*, *A. linosiphi*, *A. hieraciorum*, *A. arvensis*, *A. balcanicus*, *A. phalangomyzi*, *A. banksae*, *A. uzbekistanicus*, *A. sussi*, *A. silvaticus*, *A. avenae*, *A. rosae*, *A. ericaphidis*, *A. eadyi*, *A. viaticus*, *A. schimitscheki*, *A. ribis*, *A. setiger*, *A. asterias*, *A. matricariae* и *A. urticae*. Распоред врста *A. arvensis*, *A. erysimi*, *A. viaticus*, *A. setiger* и *A. cingulatus* на филогенетском стаблу потврђује ревизију статуса *Lysaphidius* и *Euaphidius* и њихову класификацију у оквиру рода *Aphidius*. *A. colemani*, *A. transcaspicus*, *A. platensis* и *A. asterias* са базалном позицијом на филогенетском стаблу се понашају као сестринске врсте осталим врстама рода *Aphidius*. Молекуларна карактеризација је утврдила криптичке врсте у оквиру *A. urticae* групе. Јасне еволутивне дистанце између таксона од 2,3 до 9,2% нису биле подржане и јасним морфолошким разликама. Криптичке врсте су у асоцијацији са различитим домаћинима, те је тако врста која паразитира *Aulacorthum* spp. и *Macrosiphum* spp. описана као *A. rubi*, а *A. silvaticus* као врста која паразитира *Amphorophora* spp., а *A. urticae* s.str. паразитира *Microlophium carnosum*. Паразитоиди одгајени са *Ericaphis scammelli* у асоцијацији са *Vaccinium corymbosum* су молекуларно идентификовани као *A. ericaphidis*, што је први налаз ове врсте у Европи. Пет комплекса врста се издвојило на основу анализе митохондријске ДНК: 1) *A. salicis* и *A. aquilus*; 2) *A. funebris*, *A. tanacetarius*, *A. absinthii*; 3) *A. ervi* и *A. microlophii*; 4) *A. chaetosiphonis* и *A.*

hortensis; 5) *A. rubi* и *A. rhopalosiphi*. Врсте у оквиру ових клада се не могу разликовати на основу баркодинг региона стога њихов таксономски статус треба ревидирати применом интегративног приступа. Ни једарни ни митохондријски маркер нису раздвојили *A. microlophii* од *A. ervi* иако се морфолошки и биолошки разликују, што указује на могућу непотпуну репродуктивну изолацију. *A. funebris*, *A. tanacetarius* и *A. absinthii* се нису раздвојиле на основу два маркера као засебне врсте, што може указати на адаптивну дивергенцију независних линија у асоцијацији са различитим домаћинима или стаништима. Баркодинг маркер није раздвојио *A. chaetosiphonis* и *A. hortensis*, са стопом дивергенције мањом од 1%, док су секвенце једарног гена EF1- α идентичне. Они су уско специјализовани паразитоиди, у асоцијацији са филогенетски удаљеним врстама биљних ваши, где *A. hortensis* паразитира *Liosomaphis berberidis* на *Berberis* spp., а *A. chaetosiphonis* паразитира *Chaetosiphon* sp. на *Potentilla clusiana*. Ове две врсте можда потичу од заједничког претка, чије популације су се независно адаптирале на неког претходно напуштеног или искорењеног домаћина. Молекуларни маркери су показали да је *A. rhopalosiphi* комплекс неколико полиморфних линија које испољавају различито понашање у погледу избора домаћина и станишта. Иако резултати указују на могућу криптичку специјацију у оквиру *A. rhopalosiphi* групе, нема потврда у биномијском и морфолошком смислу за такве тврдње. *A. rubi* се груписао међу примерке *A. rhopalosiphi*, са разликама у баркодинг секвенцама од 0,7 до 1,2%. Међутим дистанце у секвенцама једарног гена између ових врста од 0,6% указује на повремену хибридизацију код ових морфолошки и биолошких јасно дефинисаних врста.

Поглавље **References/ Литература** садржи листу од 192 библиографске јединице. Све цитиране научне публикације су из области од значаја за докторску дисертацију и дају допринос разумевању циљева и резултата докторске дисертације.

Поглавље **Appendix 1/ Прилог 1** садржи поновни опис врста *A. rubi* и *A. silvaticus*, са описом морфолошких карактеристика таксона, асоцијацијама са биљним вашим и биљкама домаћинима, детаљима о анализираном материјалу, сликама морфолошких карактера за сваку врсту и нови кључ за детерминацију врста из *Aphidius urticae* групе.

Поглавље **Appendix 2/Прилог 2** садржи опис врсте *Aphidius ericaphidis*, карактеристике које је издвајају од *A. matricariae* и фотографије морфолошких карактера.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Jamhour, A.**, Mitrović, M., Petrović, A., Starý, P., Tomanović, Ž. 2016 Re-visiting the *Aphidius urticae* s. str. group: re-description of *Aphidius rubi* Starý and *A. silvaticus* Starý (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Zootaxa*, 4178 (2): 278-288. IF=0.972. **M22**
2. Petrović A., Črkić J., **Jamhour A.**, Obradović O.P., Mitrović M., Starý P., Nedstam B., Tomanović Ž. (2017) First record of *Aphidius ericaphidis* (Hymenoptera, Braconidae) in Europe: North American hitchhiker or overlooked Holarctic citizen? *Journal of Hymenoptera Research*, 57 (5): 143-153. IF=0.793. **M23**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидата **Aiman M. Jamhour**, под насловом „Молекуларна карактеризација и филогенетски односи европских врста рода *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)“ -- “Molecular characterization and phylogenetic relationships among European *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)“ представља квалитетно урађен научни рад који је недвосмислено указао на значај интегративног приступа у решавању таксономски проблематичних група паразитоида. Циљеви дисертације су јасно дефинисани и базирани на добром познавању проблематике у таксономији подфамилије Aphidiinae и потреби за упоредном примени биологије, молекуларних података и морфологије у дефинисању врста. Имајући у виду да се тема докторске дисертације односи на молекуларне методе истраживања у изучавању таксономског статуса врста, може се закључити да резултати ове дисертације представљају оригинални научни допринос у таксономској карактеризацији и анализи филогенетских односа европских врста рода *Aphidius*. У методолошком смислу, у оквиру ове студије по први пут су дизајнирани прајмери и развијени протоколи за умножавање кратких фрагмената митохондријске ДНК, што је омогућило укључивање сувих примерака врста рода *Aphidius* из ентомолошких збирки у анализе филогенетских односа.

Током израде дисертације Aiman M. Jamhour је успешно савладала нове методе и показала жељу за новим сазнањима, самосталност у експерименталном раду, обради резултата и њиховом тумачењу.

Сматрамо да су досадашња научна истраживања врста рода *Aphidius* била фрагментарна и да су резултати ове студије у којој се обрађују 33 различите врсте практично први који разматрају целовиту слику о таксономији и филогенији рода на ширем европском простору. На основу прегледане докторске дисертације, увида у експериментални рад и резултате који су постигнути, Комисија закључује да су циљеви који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, у потпуности испуњени и предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватање позитивне оцене докторске дисертације **Aiman M. Jamhour**, под насловом „Молекуларна карактеризација и филогенетски односи европских врста рода *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)“ -- “Molecular characterization and phylogenetic relationships among European *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)“ и кандидату омогући јавну одбрану рада.

У Београду, 23.08.2017. године.

КОМИСИЈА:

др Милана Митровић, виши научни сарадник,
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд

др Жељко Томановић, редовни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Анђелко Петровић, ванредни професор,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет