



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Maja J. Lazarević

**MOLEKULARNA I MORFOLOŠKA
KARAKTERIZACIJA EVROPSKIH VRSTA
RODA *BINODOXYS* MACKAUER
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE:
APHIDIINAE)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2019.



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Maja J. Lazarević

**MOLEKULARNA I MORFOLOŠKA
KARAKTERIZACIJA EVROPSKIH VRSTA
RODA *BINODOXYS* MACKAUER
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE:
APHIDIINAE)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе,
осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

Niš, 2019.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Maja J. Lazarević

**MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF EUROPEAN
SPECIES OF THE GENUS *BINODOXYS*
MACKAUER (HYMENOPTERA:
BRACONIDAE: APHIDIINAE)**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2019.

MENTORI:

dr Vladimir Žikić, redovni profesor

Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Željko Tomanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Katedra za zoologiju beskičmenjaka i entomologiju

dr Marijana Ilić Milošević, docent

Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju

dr Saša S. Stanković, docent

Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju

Datum odbrane _____

Подаци о докторској дисертацији

Ментори:

Др Владимир Жикић
Редовни професор на департману за Биологију и Екологију
Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Наслов:

Молекуларна и морфолошка карактеризације европских врста
рода *Binodoxys* Maskauer (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae)

Резиме:

Род *Binodoxys* групише око 70 врста претежно холарктичког распрострањена. На основу присуства секундарних туберкула на петиолусу, другом метазомалном сегменту, род *Binodoxys* је одвојен од рода *Trioxys*. Значајни карактери за идентификацију врста унутар рода *Binodoxys* су положај примарних и секундарних туберкула петиолуса. На основу ових, и других морфолошких карактера, у Европи је до данас описано осам врста. Циљ ове студије је утврђивање молекуларних и морфолошких разлика између шест европских врста рода *Binodoxys*, као и прављење кључа за идентификацију врста. Морфолошке анализе (метода геометријске морфометрије) обухватиле су 111 петиолуса и 175 предњих крила женки. Генетичке дистанце између врста анализираних су упоређивањем баркодинг секвенце COI гена. Геометријска анализа петиолуса, указала је на постојање две морфо-групе: „*angelicae*“ (*B. angelicae* и *B. centaureae*) и „*acalephae*“ (*B. acalephae*, *B. brevicornis*, *B. heraclei* и *B. similis*). Врсте из „*angelicae*“ морфо-групе имају издужене петиолусе са великом дистанцом између примарних и секундарних туберкула, док су петиолуси „*acalephae*“ групе кратки и са мањом поменутом дистанцом. Међутим, анализом величине и облика предњих крила, утврђено је да су крила *B. similis* сличнија крилима „*angelicae*“ морфо-групе у поређењу са крилима „*acalephae*“ морфо-групе. Крила „*angelicae*“ групе су ужа, са дужим нервом радијални сектор. Молекуларном анализом потврђено је шест „добрих“ врста, дискриминисаних у две филогенетске кладе. Прву кладу чине две врсте, *B. angelicae* и *B. centaureae*, док су у другој филогенетској линији груписане остале четири врсте (*B. acalephae* + (*B. heraclei* + (*B. brevicornis* + *B. similis*))). Врсте „*angelicae*“ фило-морфогрупе се одликују издуженим главама и петиолусима, али кратким легалицама, када се пореде са врстама „*acalephae*“ групе. Електронска и светлосна микроскопија указале су и на значајне разлике у облику главе и легалица. На основу свих

анализа, потврђено је постојање свих шест врста рода *Binodoxys* раздвојених у две фило-морфо-групе: „*angelicae*“ и „*acalephae*“.

Научна област:

Биологија

Научна
дисциплина:

Зоологија

Кључне речи:

Binodoxys, геометријска морфометрија, петиолуси, крила, COI ген, SEM

УДК:

595.79: [591.557:595.7(4)(043.3)

CERIF
класификација:

B005; B250; B320

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-SA

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	PhD Vladimir Žikić, Full time professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš
Title:	Molecular and morphological characterization of European species of the genus <i>Binodoxys</i> Mackauer (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae)
Abstract:	<p>The genera <i>Binodoxys</i> assembles 70 species of Holarctic distribution. Based on the presence of secondary tubercles on the second metasomal segment (petiole), genera <i>Binodoxys</i> can be discriminated from the <i>Trioxyis</i> species. The position of the primary and secondary tubercles is taxonomic character for the separation of <i>Binodoxys</i> species. Based on the morphology of the petiole and other morphological characters, eight species have been described in European fauna. The main objective of this study is to determine the molecular and morphological differences between the six European species. Morphologically, using the geometric morphometrics method, 111 petioles and 175 forewings of females were analysed. Molecular analysis was applied using the barcoding COI gene. The geometric morphometrics method of petioles showed the existence of two morpho-groups: „<i>angelicae</i>“ (<i>B. angelicae</i> и <i>B. centaureae</i>) and „<i>acalephae</i>“ (<i>B. acalephae</i>, <i>B. brevicornis</i>, <i>B. heraclei</i> и <i>B. similis</i>). Species from the „<i>angelicae</i>“ morpho-group have elongated petioles long distance between the primary and secondary tubercles, while the petioles of “<i>acalephae</i>” morpho-group are short and with smaller intertubercular distance. The geometric morphometrics of forewings, showed that the <i>B. similis</i> has similar wing morphology to that in “<i>angelicae</i>” morpho-group. Forewings of “<i>angelicae</i>” morpho-group were narrowed, and with longer radial sector vein, when compared to the members of “<i>acalephae</i>” group. Molecular analysis confirmed the existence of six species, which are discriminated in two phylogenetic clades. The first clade clusters two species (<i>B. angelicae</i> and <i>B. centaureae</i>), while the remaining four species are grouped in the second lineage (<i>B. acalephae</i> + (<i>B. heraclei</i> + (<i>B. brevicornis</i> + <i>B. similis</i>))). Mapping the phylogeny over the morphological data showed that phylogenetically closer species have a similar petiole shape, but not forewings. Scanning electron microscopy revealed differences in shape and size of the heads and ovipositor. Members of “<i>angelicae</i>” phylo-morpho-group have long petioles and heads, but short ovipositors. Based on all the analyses applied, the</p>

existence of six *Binodoxys* species classified into two phylo-morpho groups was confirmed.

Scientific
Field:

Biology

Scientific
Discipline:

Zoology

Key Words:

Binodoxys, the geometric morphometrics, petioles, wings, COI, SEM

UDC:

595.79: [591.557:595.7(4)(043.3)

CERIF
Classification:

B005; B250; B320

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-SA



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	Монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Маја Ј. Лазаревић
Ментор, МН:	Владимир Жикић
Наслов рада, НР:	Молекуларна и морфолошка карактеризација европских врста рода <i>Binodoxys</i> Maskauer (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae)
Језик публикације, ЈП:	Српски
Језик извода, ЈИ:	Енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2019.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/	8 поглавља, 122 страна, 123 цитата, 13 табела, 35 slika
Научна област, НО:	Биологија
Научна дисциплина, НД:	Зоологија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	
УДК	595.79: [591.557:595.7(4)(043.3)]
Чува се, ЧУ:	Библиотека
Важна напомена, ВН:	уколико је рад рађен ван факултета (у лабораторији)
Извод, ИЗ:	апстракт, не мање од 50 и не више од 250 речи

Датум прихватања теме, **ДП**: 25.09.2017.

Датум одбране, **ДО**:

Чланови комисије, Председни

Члан:

Члан:

Члан,



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	Monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Maja J. Lazarević
Mentor, MN :	Vladimir Žikić
Title, TI :	Molecular and morphological characterization of European species of the genus <i>Binodoxys</i> Mackauer (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae)
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2019
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradaska 33.
Physical description, PD : <small>(chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)</small>	8 chapters, 122 pages, 123 references, 13 tables, 35 pictures
Scientific field, SF :	Biology
Scientific discipline, SD :	Zoology
Subject/Key words, S/KW :	
UC	595.79: [591.557:595.7(4)(043.3)]
Holding data, HD :	Library
Note, N :	
Abstract, AB :	

Accepted by the Scientific Board on, ASB:	25.09.2017.
Defended on, DE:	
Defended Board, DB:	President:
	Member:
	Member:
	Member, Mentor:

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta III43001 „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Vladimiru Žikiću, na angažovanju, vremene i brojnim sugestijama i ispravkama koje su mi bile od izuzetnog značaja tokom izrade ove teze. Takođe, veoma sam zahvalna prof. dr Željku Tomanoviću na pomoći prilikom determinacije parazitoida i svim savetima i sugestijama, kao docentima dr Marijani Ilić Milošević i Saši S. Stankoviću na brojnim sugestijama i ispravkama.

Profesorki dr. Ani Ivanović sam neizmerno zahvalna na pomoći oko razumevanja metode geometrijske morfometrije, pre svega na korisnim savetima i ispravkama tokom dugogodišnjeg korišćenja metode i uloženom vremenu.

Za uvođenje u svet molekularne taksonomije veoma sam zahvalna prof. dr Milani Mitrović i prof. dr Anđeljku Petroviću.

Zahvaljujem prof. dr. Stevi Najmanu i osoblju laboratorije za elektronsku mikroskopiju na pomoći u vezi sa skening mikroskopijom.

Zahvaljujem se svim kolegama iz laboratorije Bioekocen i laboratorije za sistematiku biljaka na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu za ustupanje prostora za rad i dobru atmosferu za rad tokom svih ovih šest godina.

Porodici se zahvaljujem na strpljenju i podršci koju su mi pružali tokom školovanja.

Ovaj rad posvećujem Olji i mojim roditeljima.

Autor

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Opšte karakteristike familije Braconidae	1
1.1.1	Biologija familije Braconidae	1
1.1.2	Filogenetski odnosi	5
1.2	Biologija, ekologija i sistematika podfamilije Aphidiinae.....	8
1.2.1	Razviće parazitoida.....	9
1.2.2	Distribucija i diverzitet biljnih vaši i specifičnost parazitoida prema domaćinu 10	
1.2.3	Sistematika i filogenija podfamilije Aphidiinae	11
1.2.4	Opšte karakteristike podtribusa Trioxina.....	14
1.3	Morfologija, biologija, ekologija i sistematika vrsta roda <i>Binodoxys</i>	17
1.3.1	Morfologija vrsta roda <i>Binodoxys</i>	17
1.3.2	Biologija i ekologija vrsta roda <i>Binodoxys</i>	20
1.3.3	Sistematika, morfologija, biologija i distribucija evropskih vrsta roda <i>Binodoxys</i> 23	
1.4	Molekularni markeri korišćeni u analizama podfamilije Aphidiinae.....	33
1.5	Primena geometrijske morfometrije u taksonomskim analizama pripadnika podfamilije Aphidiinae.....	34
2	Ciljevi istraživanja.....	36
3	Metodologija.....	37
3.1	Sakupljanje materijala	37
3.2	Geomterijska morfometrija	38
3.2.1	Priprema materijala geometrijsku morfometriju.....	38
3.2.2	Izbor specifičnih tačaka	40
3.2.3	Izračunavanje varijabli oblika i varijabli veličine.....	41
3.2.4	Statističke analize.....	41
3.2.5	Eksplorativne metode i metode vizuelizacije	42
3.3	Molekularna analiza	43
3.3.1	Ekstrakcija, amplifikacija i sekvenciranje DNK.....	43
3.3.2	Filogenetske analize.....	44
3.4	Evolutione promene u obliku i veličini petiolusa i krila	45
3.5	Skening elektronska mikroskopija (<i>Scanning electron microscopy</i> - SEM)	45
4	Rezultati.....	46

4.1	Geometrijska morfometrija	46
4.1.1	Razdvajanje vrsta rodova <i>Binodoxy</i> i <i>Trioxys</i>	46
4.1.2	Razdvajanje vrsta roda <i>Binodoxys</i>	48
4.1.3	Diskriminantna analiza	61
4.2	Molekularne analize	66
4.2.1	Ekstrakcija, amplifikacija i sekvenciranje DNK.....	66
4.2.2	Filogenetska rekonstrukcija	67
4.3	Evolutione promene u obliku i veličini petiolusa i krila	68
4.4	Skening elektronska i svetlosna mikroskopija	69
5	Diskusija	74
6	Zaključci	79
7	Ključ za identifikaciju evropskih vrsta roda <i>Binodoxys</i>	81
8	Literatura	83

1 Uvod

1.1 Opšte karakteristike familije Braconidae

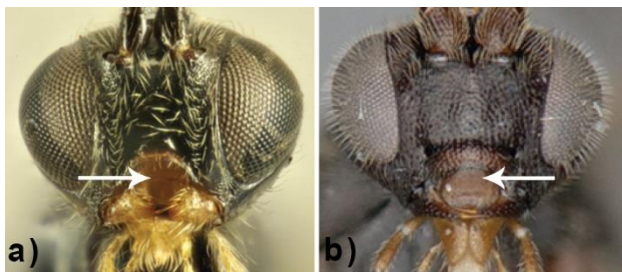
Familija Braconidae obuhvata parazitske ose, koje su zajedno sa vrstama familije Ichneumonidae grupisane u nadfamiliju Ichneumonoidea. Za razliku od srodnika iz sestrinske familije, koji parazitiraju i pauke, Braconidae su isključivo parazitoidi insekata (Shaw i Huddelston, 1991). Familija je kosmopolitskog rasprostranjenja; neke vrste, kao npr. *Aphidius matricariae* Haliday 1834, uspele su da se prilagode surovoj klimi u zoni sub-antarktika (Lee i sar., 2007). Najveći broj vrsta opisan je u umerenom klimatu Evroazije, ali je procena da je najveći diverzitet prisutan u Africi (40,12%) iako je najmanje istražena, dok je najmanji diverzitet procenjen za Australiju (2,19%) (Jones i sar., 2009). S obzirom na to da se nove vrste stalno opisuju, njihov broj svakodnevno raste. Na osnovu Chao 1 indeksa (indeksa koji na osnovu broja retkih vrsta analiziranog uzorka, predviđa ukupan broj vrsta uzorka), Jones i sar. (2009) su predvideli da u svetu egzistira čak oko 42.000 vrsta, a do sada je opisano oko 17.000 vrsta. Ne postoji usaglašenost ni oko broja podfamilija; Quicke i van Achterberg (1990) navode 45 podfamilija, Sharkey (1993) opisuje 29 podfamilija, dok Jones i sar. (2009) izdvajaju čak 47 podfamilija.

Značaj predstavnika familije Braconidae je višestruk. Naime, kao parazitoidi insekata mogu se koristiti u biološkoj kontroli (Austin i Dowton, 2000). Takođe, predstavljaju dobar model za proučavanje biodiverziteta i konzervacije (Lewis i Withfield, 1999). Braconide se mogu koristiti i kao model organizmi za proučavanje evolucije parazitizma (Gauld, 1988; Belshaw i Quicke, 2002; Zalddivar-Rivéron i sar., 2008) i domaćin-parazit interakcija (Withfield, 1998).

1.1.1 Biologija familije Braconidae

Na osnovu morfologije klipeusa (*clypeus*), hitinske pločice koja predstavlja donju marginu lica insekta i gornje usne (*labrum*) braconide su podeljene na ciklostomne i neciklostomne (Wharton i sar., 1992). Predstavnici ciklostomne grupe odlikuju se udubljenim klipeusom koji zajedno sa konkavnom gornjim usnom formira okruglo udubljenje iznad mandibula (Slika 1a). Ovoj grupi pripadaju predstavnici podfamilija Betylobraconinae, Braconinae, Doryctinae, Exothecinae, Gnampodontinae, Hormiinae, Pambolinae,

Rhysipolinae, Rhyssalinae i Rogadinae. Sa druge strane, predstavnici neciklostomne grupe imaju ravan ili konveksan klipeus i ravnu gornju usnu (Slika 1b). Neciklostomna grupa je podeljena na 3 kompleksa: helkonidni (Acampsohelconinae, Agathidinae, Amicrocentrinae, Blacinae, Charmontinae, Helconinae, Homolobinae, Macrocentrinae, Microtypinae, Meteorideinae, Orgilinae, Sigalphinae, Trachypetinae, Xyphozelinae), euforidni (Cenocoelinae, Euphorinae, Ecnominae, Meteorinae, Neoneurinae) i mikrogastroidni (Adeliinae, Cardiochilinae, Cheloninae, Ichneutinae, Khoikhoiinae, Mendesellinae, Microgastrinae i Miracinae). Pored ove dve grupe izdvaja se i afidoidni kompleks koji obuhvata tri podfamilije: Ahidiinae, Maxfischeriinae i Mesostoinae (Sharanowski, 2009).



Slika 1. Morfologija glave vrsta: a) *Bracon admotus* Papp 2000 (Braconidae: Braconinae) (preuzeto iz Loni i sar., 2016), b) *Ilidops* sp. (Braconidae: Microgastrinae) (preuzeto iz Fernandez-Triana i sar., 2017).

1.1.1.1 Regulacija domaćina

Ženke parazitoide pri polaganju jaja sekretom otrovnih žlezda parališu domaćina. Na osnovu načina parazitiranja, odnosno da li regulišu ponašanje domaćina ili ne, mogu se izdvojiti u dve grupe: idiobionti i koinobionti. Kod idiobionata, pre polaganja jaja na telo domaćina parazitoide trajno parališu domaćina, koji ne nastavlja razvoj. Ženka idiobiontskog parazitoide često polaže jaja u blizini domaćina, stoga postoji tendencija ka razvoju morfoloških adaptacija koje omogućavaju lakši pristup parazitoidnih larvi domaćinu. Većina pripadnika grupe idiobionata iz ciklostomne klada se može označiti kao ektoparazitoide. Među braconidama, podfamilije ektoparazitoide su: Braconinae, Doryctinae, Exothecinae, Gnampodontinae, Histeromerinae i Rhyssalinae (Shaw i Huddelston, 1991; Wharton i sar., 1997, Sharanowski, 2009).

Koinobiontski parazitoidi se karakterišu po tome što ženka polaže jaje/jaja u telo domaćina, pri čemu dolazi do kratkotrajne paralize domaćina koji se odmah oporavlja i nastavlja sa svojim razvojem. Pošto se jaja polažu u telo domaćina, među predstavnicima koinobiontske grupe postoji tendencija razvoja adaptacija na fiziološku odbranu od imunološkog odgovora domaćina. Kako bi se odbranile od imunološkog sistema domaćina, koinobiontski parazitoidi poseduju simbiotsku vezu sa virusima roda *Braconivirus* familije (Polydnviridae), pri čemu je genom virusa inkorporiran u genom ose. Virusi se proizvode u ovarijumima ženki kao dvolančani DNK fragmenti, a zatim se zajedno sa jajima ubacuju u domaćina (Herniou i sar., 2013). Zbog načina polaganja jaja ovi parazitoidi se označavaju i kao endoparazitoidi. Među braconidama, pripadnici neciklostomne grupe i pojedine ciklostomne podfamilije (Alysiinae i Opiinae, kao i Hormiinae i Rogadinae) označeni su kao endoparazitoidi. Smatra se da se endoparazitizam barem tri puta nezavisno razvijao u evoluciji braconida. Jednu evolucionu liniju predstavlja neciklostomna grupa, dok su druge dve u okviru ciklostomne grupe (jednu liniju čine Rogadinae i Hormiinae, dok su u drugoj liniji Alysiinae i Opiinae) (Wharton i sar., 1997).

1.1.1.2 Primarni i sekundarni parazitoidi

Parazitoidi se mogu podeliti na primarne i sekundarne; primarni parazitoidi se razvijaju u domaćinu koji sam nije parazitoid, za razliku od sekundarnih, odnosno hiperparazitoida, koji parazitiraju druge parazitoide. Ukoliko se primarni parazitoid još uvek hrani na račun svog domaćina u vreme polaganja jaja, hiperparazitoid se označava kao pravi. Pseudohiperparazitoid polaže jaje u primarnog parazitoida nakon što primarni parazitoid prekine da se hrani na račun svog domaćina. Pseudohiperparazitoidi su zabeleženi među predstavnicima familije Braconidae. Tako na primer, vrste roda *Meteoridea* Ashmead 1900, podfamilije Meteorinae parazitiraju larve pojedinih vrsta podfamilije Microgastrinae, ali ženke polažu jaja tek nakon što mikrogastroidna larva napusti svog domaćina. Larva *Meteoridea* vrsta se razvija u lutki mikrogastrične koja se nalazi u kokonu, zbog čega se ovakva interakcija ne označava kao hiperparazitizam (Shaw i Huddelston, 1991). Iako hiperparazitoidi postoje kod sestrinske familije Ichneumonidae, među vrstama familije Braconidae nisu zabeleženi. (Shaw i Huddelston, 1991).

1.1.1.3 Izbor stadijuma domaćina

Na osnovu stadijuma koji ženka parazitoida odabira za polaganje jaja mogu se razlikovati parazitoida jaja, parazitoidi larvi, pupalni i adultni parazitoidi. Parazitoidi jaja polažu svoja jaja u jaja domaćina i ceo period larvenog razvića parazitoida se odvija u jajetu domaćina (na primer, Mymaridae ili Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea)) (Huber, 1986). Među braconidama ne postoje pravi parazitoidi jaja. U stvari, braconide su jajno-larvalni parazitoidi jaja i larvi. Ženka parazitoida može da polaži jaja u jaja domaćina, ali se njena larva razvija tek nakon što se u jajetu domaćina formira larva. Ovakav tip parazitizma se javlja kod predstavnika podfamilije Helconinae i Ichneutinae. S druge strane, vrste podfamilije Cheloninae polažu jaja direktno u larvu koji je već razvijena u jajetu domaćina (Shaw i Huddeslton, 1991).

Najveći broj braconida predstavlja parazitoide larvi. Oni polažu jaja u larveni stupanj domaćina i celokupno razviće parazitoidne larve se odvija u larvenom stadijumu domaćina. Adulti nekih braconida kao npr. *Glyptapanetels porthetirae* (Microgastrinae) (Muesebeck 1928) izlaze iz drugog larvenog stupnja domaćina, dok mnoge vrste roda *Cotesia* (Microgastrinae) (Cameron 1891) izleću iz zrelih gusenica (V stupanj).

Među predstavnicima familije Braconidae nema pupalnih parazitoida, što predstavlja još jednu karakteristiku po kojoj se mogu odvojiti od osa familije Ichneumonidae, kod kojih se javlja pupalni vid parazitizma. Međutim, larveno-pupalni parazitoidi su prisutni u obe familije. U familiji Braconidae, predstavnici podfamilija Alysiinae i Opiinae grupišu parazitoide koji polažu jaja u larve muva podreda Cyclorrhapha, ali se ulutkavaju u puparijumu domaćina (Shaw i Huddelston, 1991).

Adultni parazitizam nije čest kod braconida. Predstavnici podfamilije Neoneurinae polažu jaja u abdomene mrava radnika (Formicidae), dok predstavnici podfamilije Euphorinae parazitiraju adulte redova Coleoptera (kao na primer *Dinocampus coccinellae* (Schrank 1802) i vrste roda *Perilitus* (Nees 1819) koje parazitiraju bubamare), Hymenoptera (vrste roda *Syntretus* (Förester 1862) su pseudohiperparazitoidi pčela i predstavinka familije Ichneumonidae (van Achterberg i Haeselbarth, 2003)), Neuroptera (vrste roda *Chrysopophthorus* Goidanich 1948), Hemiptera (vrste roda *Peristenus* Förester 1862) (Shaw, 1997).

Predstavnici podfamilije Aphidiinae obično polažu jaja u nimfe biljnih vaši (Aphididae) ali je zapaženo i polaganje jaja u adultni stadijum (Shaw i Huddelston, 1991).

1.1.1.4 Broj parazitoida po domaćinu

Parazitoidi mogu biti solitarni ili gregarni, pa tako i predstavnici familije Braconidae. Većina braconida su solitarni parazitoidi, što znači da ženke polažu jedno jaje po domaćinu. Na primer, to je poznato kod predstavnika podfamilija Adeliinae, Agathidinae, Alysiniinae, Aphidiinae, Cenocoeliinae, Cheloninae, Homolobinae, Neoneurinae, Opine i druge. Gregarno razviće predstavlja polaganje više jaja po domaćinu (superparazitizam). Ovo je zabeleženo kod velikog broja predstavnika podfamilije Microgastrinae (*Cotesia*, *Glyptapanteles* (Ashmead 1898), *Diolcogaster* (Ashmead 1900), *Microgaster* (Latreille 1804), *Microplitis* (Förster 1862), *Apanteles* Förster 1862), ali i kod predstavnika podfamilije Histomerinae, Meteorideinae i pojedinih predstavnika podfamilija Meteorinae i Euphorinae (Wharton i sar., 1997).

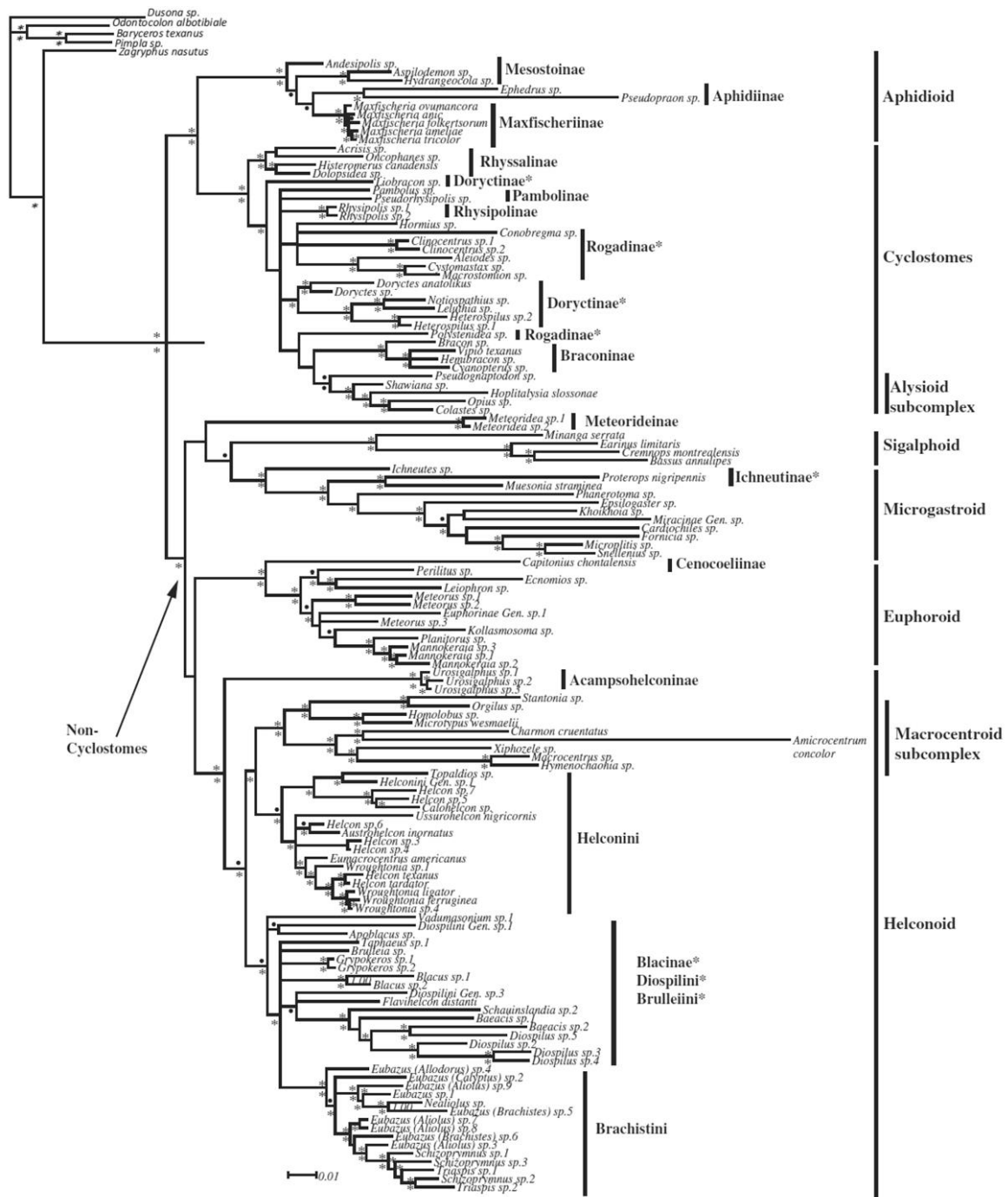
Kod predstavnika podfamilije Macrocentrinae javlja se poseban vid gregarnog razvića, poliembrionija. Poliembrionija je pojava kada se od jednog jajeta uzastopnim deobama formira veći broj embriona. (Shaw i Huddelston, 1991).

1.1.2 Filogenetski odnosi

Iako veliki broj naučnika širom sveta proučava ovu grupu parazitoida, filogenetski odnosi u okviru familije su još uvek nerazjašnjeni. Jedan deo problema potiče od velike raznolikosti braconida, odnosno iz činjenice da je prikupljanje podataka o morfologiji i biologiji velikog uzorka često nepraktično (Sharanowski i sar., 2011).

Na osnovu četiri molekularna markera, dva jedarna gena (28S, 18S rRNK) i dva gena koji kodiraju proteine (CAD i ACC), Sharanowski i sar. (2011) analizirali su filogenetske odnose između podfamilija unutar familije Braconidae. Maximum Likelihood metodom je dobijeno stablo na kome se može uočiti podela braconida na tri osnovne filogenetske klade: afidoidni kompleks, ciklostome i neciklostome. U okviru ciklostoma izdvaja se alizoidni kompleks koji grupiše dve podfamilije (Opiinae i Alysiniinae). Neciklostomne ose su grupisane

u sledeće komplekse: sigalfoidni, mikrogastroidni, euforoidni, makrocentroidni i helkonoidni kompleks. Unutar neciklostomne grupe, prvu kladu čine predstavnici sigalfoidnog i mikrogastroidnog kompleksa. Sledeću filogenetsku liniju čine vrste euforoidnog kompleksa. Macrocentroidni i helkonoidni kompleks se su filogenetski najrodniji, pri čemu vrste tribusa Helconini (helkonoidnog kompleksa) su grupisane sa predstavicima magrocentroidnog kompleksa. Preostali tribusi helkonoidnog kompleksa odvojeni u zasebne klade, od koje se odvaja tribus Brachistini (Slika 2).



Slika 2. Filogenetski odnosi u glavnih grupa familije Braconidae. Stablo je konstruisano metodom Maximum Likelihood na osnovu sekvenci 28S, 18S, CAD i ACC gena (preuzeto iz Scharanowski i sar., 2011).

1.2 Biologija, ekologija i sistematika podfamilije Aphidiinae

Sa veličinom tela od 1,5-3,5 mm predstavnici podfamilije Aphidiinae spadaju u najsitnije ose među brakonidama (van Achterberg, 1997). Afidiine su parazitoidi biljnih vaši familije Aphididae (Hemiptera), zbog čega se često koriste u biološkoj kontroli (Clausen, 1978).

Do sada je opisano preko 500 vrsta (Žikić i sar., 2017b) rasprostranjenih na svim kontinentima, osim Antarktiku. Najveći broj vrsta opisan je u umerenom klimatskom području Azije i Evrope, ali su rasprostranjene u subarktičkim i subantarktičkim predelima sa manjom zastupljenošću. Na primer, na ostrvu Svalbard, koje se nalazi između Norveške i Arktika, opisane su dve vrste: *Diaeretellus svalbardicum* Chaubet & Tomanović 2012 i *Aphidius leclanti* Tomanović & Chaubet 2012 (Chaubet i sar., 2013). Iako je većina vrsta rasprostranjena u Holarktiku, neki rodovi su karakteristični za južnu hemisferu, na primer *Pseudephedrus* Starý 1972 (Starý, 1976), koji je rasprostranjen u Čileu i na Kubi i *Parephedrus* Starý & Carver 1971, koji je pronađen samo u Australiji (Starý i Carver, 1971), te se smatraju najstarijim u okviru podfamilije Aphidiinae i podržavaju teoriju po kojoj afidiine vode poreklo sa Gondvane (Schlinger, 1974; Belshaw i sar., 2000). Otkrićem najstarijeg fosila afidiina iz rane krede, koji je izdvojen u novi rod *Archephedrus* (*A. stolamissus* Ortega-Blanco, Bennett, Delclòs & Engel 2009), Ortega-Blanco i sar. (2009) sugerišu da afidiine vode poreklo sa severne hemisfere. Ovu tezu upotpunjuju činjenicom da su u ćilibaru krede pronađeni fosilni ostaci biljnih vaši.

Zbog svoje specifične biologije, često su bili odvajani u posebnu familiju Aphidiidae (Starý, 1970) u okviru nadfamilije Ichneumonoidea. Nakon molekularnih analiza (Quicke i van Achterberg, 1990; Wharton i sar., 1992; Belshaw i Quicke, 1997; Dowton i sar., 1998, Sharanowski, 2011) ova grupa parazitoida je dobila status podfamilije u okviru familije Braconidae. Pored afidiina, biljne vaši parazitiraju i pojedini predstavnici podfamilije Aphelinidae. Pored biologije, od ostalih podfamilija brakonida se odvajaju i po morfologiji, odnosno prisustvu fleksibilne suture između drugog i trećeg tergita abdomena (Shaw i Huddelston, 1991).

Specijalizacija prema domaćinu se kod afidiina razvila u nekoliko pravaca kada je u pitanju morfologija i biologija. Kod većine predstavnika podfamilije ne postoje specijalne morfološke adaptacije (kao na primer kod predstavnika roda *Ephedrus* (Haliday 1833)). Kod vrsta roda *Praon* (Haliday 1833) ženke prilikom polaganja jajeta, vaš pridržavaju prednjim nogama. Vrste roda *Monoctonus* (Haliday 1833) ubadanjem domaćina u torakalnu gangliju

vrše paralizu vaši, pri čemu koriste i prednje noge za ovipoziciju. Morfološke adaptacije su zabeležene samo kod vrsta rodova *Acanthocaudus* (Smith 1944), *Binodoxys* (Mackauer 1960) i *Trixys* (Haliday 1833), gde se na poslednjem metazomalnom segmentu ženki javljaju viljuškasti nastavci koji služe za pridržavanje vaši (Völkl i Mackauer, 2000).

1.2.1 Razviće parazitoida

Ženka se pomoću rinarija (mirisnih brazdi) koje se nalaze na antenama orijentiše pri potrazi za domaćinom. Kada antenama opipa biljnu vaš, ženka se priprema za ovipoziciju, pri čemu se metazoma izdužuje i savija ispod tela i ubada domaćina. Ženka polaže jaja, bez obzira da li je došlo do parenja ili ne. Iz neoplođenih jaja razvijaju se mužjaci, dok se ženke razvijaju iz oplođenih jaja (*arrhenotoky*). Prilikom ubadanja vaši, pri svakom ubodu se ubacuje samo po jedno jaje.

Veoma sitna jaja parazitoida bubre u hemolimfi domaćina dostižući svoju punu veličinu, kada započinje brazdanje. Pored jaja, ženka prilikom ovipozicije ubacuje u telo domaćina i teratocite, koje imaju ulogu u ishrani, ali i u odbrani parazitoida od imunog odgovora domaćina (Beckage i Gelman, 2004). Parazitoidna larva I stupnja posle glavenog regiona ima 13 segmenata (Starý, 1966). Larva na prvom stupnju razvića se karakteriše prisustvom velikog borja dorzalnih dlaka na poslednjem torakalnom segmentu, dok je analni segment veoma sklerotizovan i poseduje kratke dodatne nastavke (Beirne, 1942). Na II stupnju nema razvijene mandibule; poslednji segment je manje sklerotizovan i ne nosi nastavke. Larva poslednjeg, III stupnja ne poseduje glavenu kapsulu (*cauda*) i veoma je mobilna kako bi mogla da isplete kokon (Starý, 1966). Zrela larva III stupnja ubija vaš, i nakon toga progriza otvor na ventralnoj strani i lepi vaš za biljku sekretima pljuvačnih žlezdi. Larveno razviće traje od 18 do 24 dana, u zavisnosti od spoljašnjih faktora. Larva poslednjeg stupnja plete kokon unutar prazne ljuštore biljne vaši (tzv. „mumija“), kome boja varira od bele do mrke i koji je sa ventralne strane zalepljen za biljku domaćina. Lutka je slobodna (*pupa libera*); noge i antene prate ventralnu stranu tela i pokretne su; prednja krila su sklopljena i pokrivaju zadnja krila (Starý, 1966). U stadijumu lutke traje tri do pet dana, nakon čega adult progriza cirkularni otvor u blizini kornikula mumije. Otvor na mumiji je sa pravilnim ivicama, na osnovu čega se može razlikovati od hiperparazitoida, kod kojih je ovaj otvor nepravilnog oblika (Mackauer, 1959a). Nakon metamorfoze, adulti izlaze iz mumije i hrane se mednom rosom (ukoliko je dostupna)

ili nektarom cvetova sa plitkom čašicom, nakon čega sledi potraga za partnerom i parenje. Hibernacija i dijabauza se dešavaju u stadijumu pre-lutke (Stary 1966).

1.2.2 Distribucija i diverzitet biljnih vaši i specifičnost parazitoida prema domaćinu

Do sada je opisano preko 5.000 vrsta biljnih vaši rasprostranjenih pre svega u Palearktiku i Nearktiku (Blackman i Eastop, 2000). Iako su neke vrste opisane u tropskim oblastima južne Zemljine hemisfere, diverzitet biljnih vaši je mali. Mogući razlog za ovakvo stanje objasnili su Dixon i sar. (1987) i Mackenzie i sar. (1994). Naime, oni smatraju da preveliki diverzitet biljaka u tropskim predelima, u proseku oko 200 vrsta po metru kvadratnom, onemogućava disperziju biljnih vaši da prelaze sa jedne na drugu biljku iste vrste zbog njihove prostorne udaljenosti. Sa druge strane, Paleartik se ne odlikuje visokim diverzitetom biljaka (oko 20 po metru kvadratnom), te stoga biljne vaši lako pronalaze istu biljku hraniteljku.

Biljne vaši su klasifikovane u 25 podfamilija (Remaudière i Remaudière, 1977), koje su dalje podeljene na tribuse. U Srbiji je do sada registrovano oko 450 vrsta, klasifikovanih u 14 podfamilija. Najbrojniji su predstavnici podfamilije Aphidinae, i to tribusi Aphidini i Macrosiphini (Petrović-Obradović, 2003).

Afidiinae parazitiraju biljne vaši iz čak 19 podfamilija. Zabeleženo je da *Ephedrus plagiator* (Nees 1811) parazitira veliki broj biljnih vaši iz čak 7 podfamilija, dok najveći broj zabeleženih domaćina ima vrsta *Lysiphlebus fabarum* (Marshall 1896), ali sve vaši pripadaju podfamiliji Aphidinae (Žikić i sar., 2017b).

U zavisnosti od broja domaćina (broja vrsta, rodova i podfamilija), afidiine je moguće podeliti na pet grupa:

- Monofagija – parazitoidi koji parazitiraju samo jednu vrstu domaćina
- Uska oligofagija – parazitoidi napadaju nekoliko vrsta, koje najčešće pripadaju jednom rodu i jednoj podfamiliji
- Umerena oligofagija – parazitoidi parazitiraju nekoliko vrsta iz najčešće dva različita roda koji pripadaju jednoj podfamiliji
- Široka oligofagija – afidiine koje parazitiraju do tridesetak vaši, koje pripadaju većem broju rodova (do 11) i uglavnom su grupisane u istu podfamiliju

- Polifagija „*sensu lato*“ – parazitiraju veliki broj vaši (do 168) iz većeg broja rodova (58) i više podfamilija (do 7) (Starý, 1981a; Žikić i sar., 2017b).

Na osnovu podataka o biologiji 505 vrsta podfamilije Aphidiinae i primenom metoda samoorganizujuće mape (SOM), Žikić i sar. (2017b) su uočili da se u svakom tribusu podfamilije Aphidiinae javljaju polifagne vrste. Najveći broj polifagnih vrsta je u rodu *Aphidius* (20), koji se ujedno smatra i jednim od filogenetski najmlađih (Žikić i sar., 2017a).

1.2.3 Sistematika i filogenija podfamilije Aphidiinae

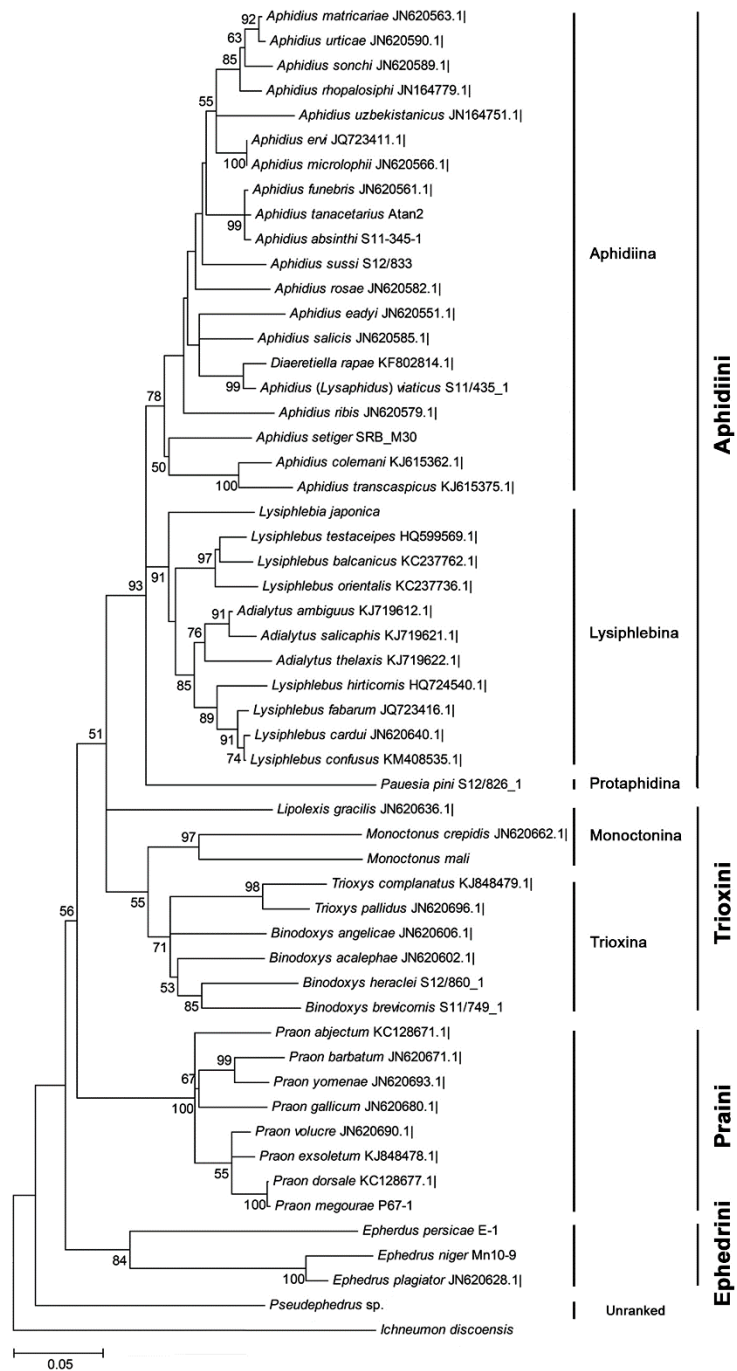
Klasifikacija unutar podfamilije Aphidiinae se razlikuje od autora do autora. Postoji nekoliko hipoteza o broju tribusa u okviru podfamilije. Opšte prihvaćenu podelu afidiina dao je Mackauer (1961), koji je predstavnike podfamilije svrstao u četiri tribusa: Aclitini, Ephedrini, Praini i Aphidiini.

Neki autori zastupaju tri-tribusnu hipotezu po kojoj je moguće razlikovati sledeće tribuse: Ephedrini, Praini i Aphidiini *sensu lato*, pri čemu poslednji tribus obuhvata dva podtribusa Aphidiina i Trioxina (Mackauer, 1961; Tobias, 1967; Smith i sar., 1999; Sanchis i sar., 2000). Međutim, većina autora prihvata postojanje četiri tribusa: [Ephedrini + (Praini + (Trioxini + Aphidiini))] (Tremblay i Calvert, 1971; O'Donnell, 1989; Finlayson, 1990; Belshaw i Quicke, 1997).

Najčešća filogenetska neslaganja jesu o tome koji je tribus bazalni za sve Aphidiinae Na osnovu različitih filogenetskih analiza svaki tribus je bio postavljen kao ishodni. Tako je *Ephedrus* u osnovi kladograma na osnovu morfologije adulta (Mackauer, 1961; Gärdenfors, 1986) i sekvenci DNK (Belshaw i Quicke, 1997; Sanchis i sar., 2000), Praini na osnovu načina ulutkavanja, anatomije otrovnih žlezda (Tobias, 1967; Tobias i Kyriak, 1971; Edson i Vinson, 1979) i DNK sekvenci (Smith i sar., 1999), Aclitini po biologiji, odnosno ponašanju (Chou, 1984) i DNK sekvenci (Kambhampati i sar., 2000) i Aphidiini (Trioxina) na osnovu morfologije poslednjeg larvenog stupnja (Finlayson, 1990).

Derocles i sar. (2016) su primenom 7 molekularnih markera rekonstruisali filogenetsko stablo za afidiine. U analizu je uključeno 273 jedinke, odnosno pripadnici 29 vrsta, pri čemu nedostaju jedinke tribusa Trioxini. Analizom, 16S i EF-1 α je dobijeno da ishodni tribus predstavljaju Ephedrini, međutim kod drugih pojedinačnih analiza ovaj rezultat varira.

Analizom 28S rRNK kao bazalni tribus predstavljeni su Praini, cyt-b i LWRh na ovo mesto postavljaju tribus Aphidiini, dok ArgK postavlja kao ishodnu grupu takson *Ephedrus helleni* Mackauer 1968 iz tribusa Ephedrini. U radu Žikić i sar. (2017a), gde je analiziran i rod *Pseudephedrus*, otvara se pitanje formiranja i petog tribusa, jer se na osnovu COI sekvence, rod *Pseudephedrus* izdvojio kao zaseban tribus, u konstruisanom filogenetskom stablu postavljen kao bazalni za podfamiliju. Kao najstariji tribus izdvojen je *Pseudephedrus*, a zatim Ephedrini. Tribus Aphidiini sa nekoliko podtribusa je postavljen na vrhu filogenetskog stabla, pri čemu je podtribus Aphidiina označen kao evolutivno najmlađi (Slika 3).



Slika 3. Filogenetsko stablo konstruisano metodom „Maximum Likelihood“ na osnovu sekvenci COI gena (preuzeto iz Žikić i sar., 2017a).

1.2.4 Opšte karakteristike podtribusa Trioxina

Prema mnogim analizama, tribus Trioxini obuhvata dva podtribusa: Monoctonina i Trioxina. Međutim, na osnovu molekularnih istraživanja, rod *Lipolexis* Förster 1862, pokazuje tendenciju izdvajanja u poseban, treći tribus (Slika 3) (Žikić i sar., 2017a).

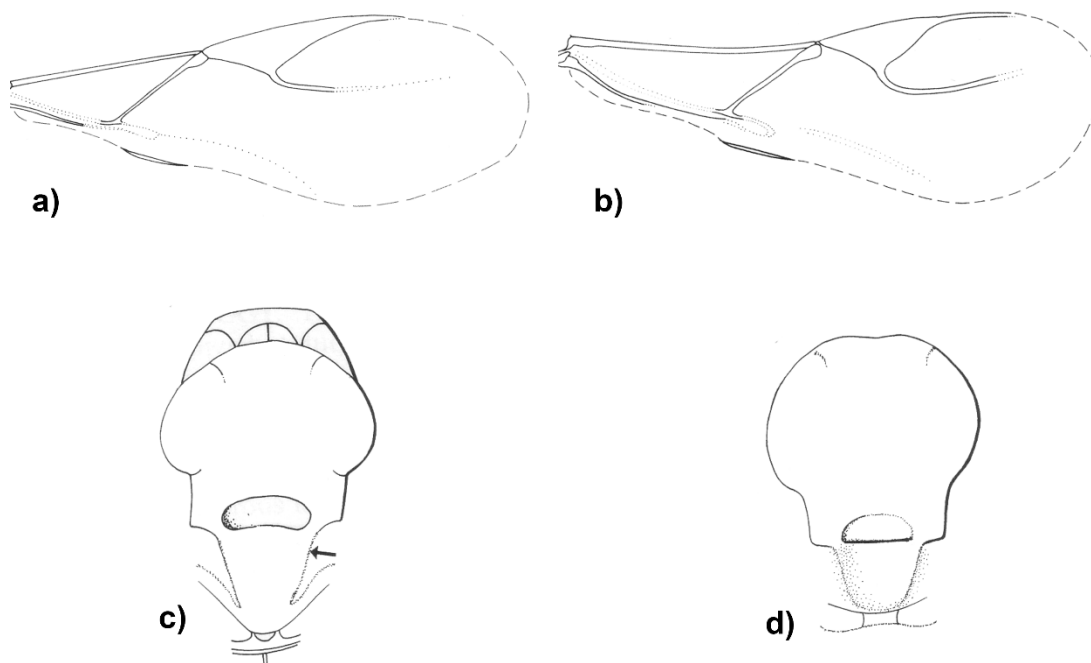
Sve vrste podtribusa Trioxina imaju veoma redukovanu nervaturu krila. Na krilnoj ploči može se uočiti trouglasta stigma na koju se sa jedne strane nastavlja metakarpalni ili radijalni nerv, dok se sa druge strane pruža nerv radijalni sektor. Dužina oba pomenuta nerva dosta varira i značajni su taksonomski karakteri. Morfologija hipopigijuma ženki je takođe karakteristična za podtribus. Naime na osmi metazomalni segment ženki se nastavljaju parni ili neparni lučno savijeni nastavci na kojima se nalaze sete ili dlake različite dužine. Broj i oblik nastavaka, kao i broj seta i njihov raspored su taksonomski karakteri (Starý, 1981b). Podtribus Trioxina obuhvata jedanaest rodova: *Acanthocaudus*, *Betuloxys* (Mackauer 1960), *Binodoxys*, *Bioxys* (Starý & Schlinger 1967), *Boreogalba* Mackauer 1962, *Cristicaudus* Starý & Remaudière 1982, *Dactylonotum* Chou & Xiang 1981, *Fissicaudus* Starý & Schlinger 1967, *Parabioxys* Shi & Chen 2001, *Sergeyoxys* Davidian 2016 i *Trioxys* Haliday 1833 (Yu i sar., 2012, Davidian, 2016).

Acanthocaudus je nearktičkog rasprostranjenja i tri vrste koje su do sada opisane, *A. bicolor* Kula 2017, *A. caudacanthus* (Smith 1944) i *A. tissoti* (Smith 1944) se mogu naći u Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama (Kula i sar., 2017). Parazitiraju biljne vaši roda *Uroleucon* Mordvilko 1914, osim jednog slučaja kada je vrsta *A. caudacanthus* zabeležena na vaši *Aphis gossypii* Glover 1887 (Smith, 1944). Jedini nalaz izvan nearktičkog regiona jeste pronalazak vrste *A. tissoti* na Kubi (Starý, 1981c).

Rod *Betuloxys* obuhvata deset vrsta rasprostranjenih na severnoj hemisferi, pri čemu su vrste *B. compressicornis* (Ruthe 1859), *B. hortum* (Starý 1960) i *B. kostyukovi* Davidian 2005 prisutne u Evropi. Parazitira vaši iz sledećih rodova: *Betacallis* Matsumura 1919, *Capitophorus* Van der Goot 1913, *Euceraphis* Walker 1870, *Myzocallis* Passerini 1860 i *Takecallis* Matsumura 1917 (Starý, 1976, 1978, 1989; Mackauer, 1960; Kavallieratos i sar., 2004; Davidian, 2005).

Rod *Bioxys* je monotipski i obuhvata samo jednu vrstu *B. japonicus* (Starý & Schlinger 1967) orijentalnog rasprostranjenja i parazitira vaš *Machilaphis machili* (Takahashi 1928) u četinarskim šumama Tajlanda (Starý i sar., 2010b).

Boreogalba obuhvata dve vrste, od kojih je *B. gladifer* (Mackauer 1962) rasprostranjena u Kanadi (Mackauer, 1962), a *B. julianae* Todorov 2006 se može pronaći u Bugarskoj, ali domaćin još uvek nije poznat pošto je tipski primerak sakupljen na livadi u blizini planinskog vrha košenjem (Todorov, 2006). Rod je morfološki veoma sličan vrstama roda *Trioxys*, ali se razlikuju prednja krila i *mesoscutum*. Prednja krila su šira kod vrsta roda *Boreogalba*; nerv radijalni sektor je kraći, dok je stigma izdužena i radijalni sektor se gotovo ne uočava. Posteriorni deo mezoskutuma je izdužen kod vrsta roda *Boreogalba* (Slika 4).

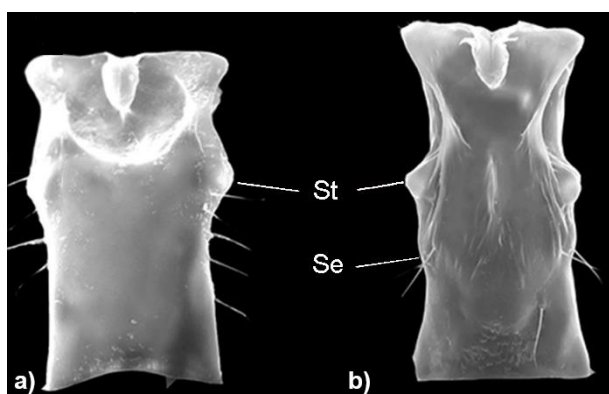


Slika 4. Morfologija prednjih krila i mezoskutuma rodova *Boreogalba* (a, c) i *Trioxys* (b, d) (Preuzeto iz van Achterberg, 1997).

Vrste roda *Cristicaudus* karakteristične su za Indiju i Nepal, osim jedne vrste, *C. bicolor* Starý & Remaudière 1982, koja je opisana u Meksiku (Starý i Remaudière, 1982). *Dactylonotum* je monotipski rod sa jednom vrstom *D. schaanxiense* Chou & Xiang 1981 koja je pronađena u Kini (Chen i Shi, 2001). *Fissicaudus* obuhvata sedam vrsta orijentalnog rasprostranjenja (Starý i Schilinger, 1967; Takada, 1968; Starý i sar., 2010a). *Parabioxys songobiensis* Shi & Chen 2001 je jedina vrsta roda *Parabioxys* i orijentalnog je rasprostranjenja; zabeleženo je da parazitira samo vrstu *Greenidea kuwanai* (Pergande 1906)

koja se hrani na *Quercus dentata* Thunb. 1784 (Starý i sar., 2010a). *Sergeyoxis* je monotipski rod sa vrstom *S. monoceratus* Davidian 2016 koja je rasprostranjena u azijskom delu Rusije, a od ostalih Trioxiina se razlikuje po tome što poseduje neparan nastavak između poslednja dva sternita metazome (Davidian, 2016)

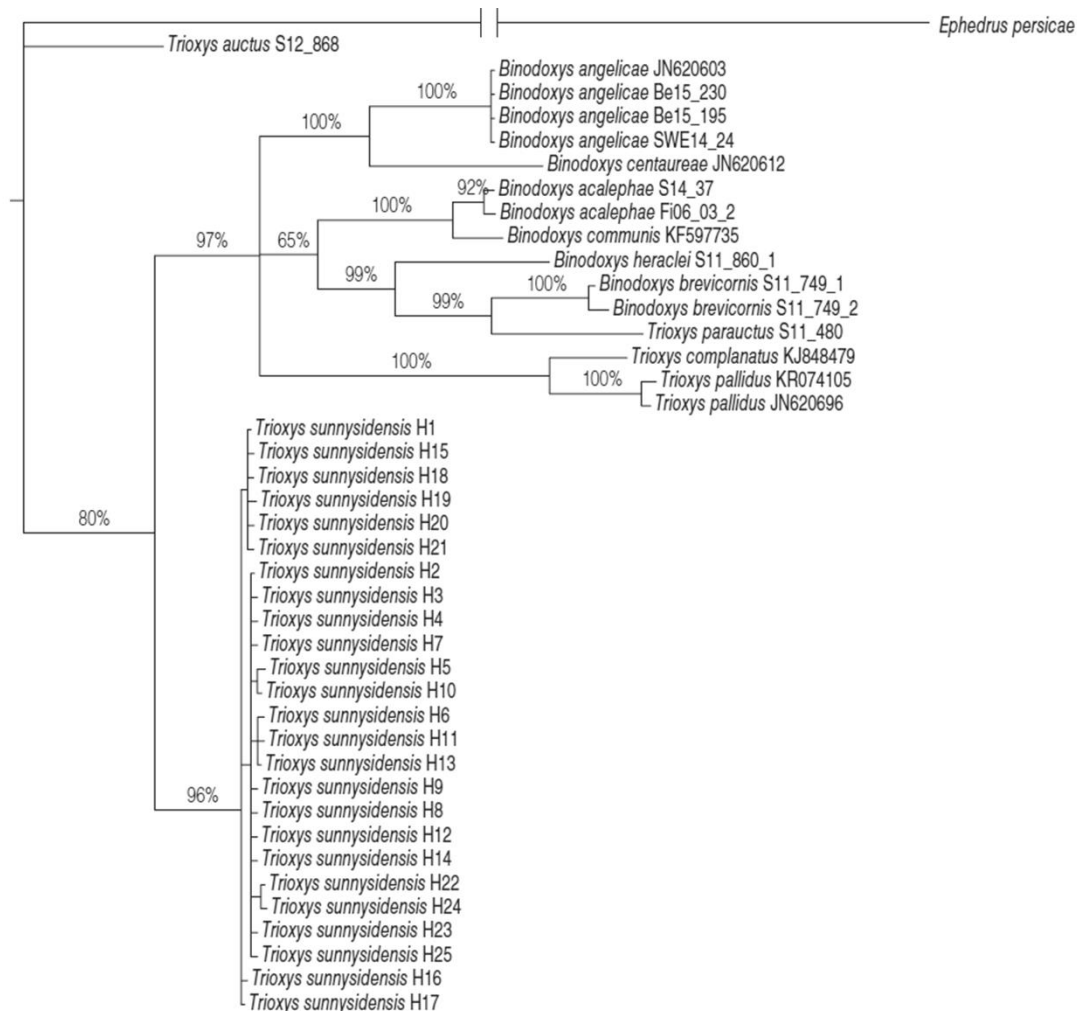
Rodovi sa najviše vrsta u okviru podtribusa Trioxina su *Binodoxys* i *Trioxys*, svaki sa oko 70 vrsta opisanih širom sveta (Yu i sar., 2012, Žikić i sar., 2017b). Kao i prethodno pomenuti rodovi, i vrste roda *Binodoxys* su dugo bile opisivane kao pripadnici roda *Trioxys*, sve do 1959. godine kada je Mackauer podrod *Binodoxys* podigao na rang roda. Mackauer je izdvojio novi rod na osnovu prisustva sekundarnih tuberkula na petiolusu, odnosno drugom metazomalnom segmentu, koje se ne javljaju kod vrsta roda *Trioxys* (Slika 5). Marsh i sar. (1987) pored razlike u petiolusima, navode i razlike u nervaturi krila, odnosno da li je prva subdiskoidalna ćelija zatvorena (*Binodoxys*) ili otvorena (*Trioxys*).



Slika 5. Uporedni prikaz petiolusa vrsta: a) *Trioxys pallidus* (Haliday, 1833), b) *Binodoxys acalephae* (Marshall 1896); St – primarne (spirakularne) tuberkule, Se – sekundarne tuberkule (nomenklatura je data na osnovu Pike i Starý, 1995).

Filogenetski odnosi na osnovu COI gena ukazuju da se ne radi o monofiletskim rodovima (Čkrkić i sar., 2019). Naime, *Trioxys auctus* (Haliday 1833) je odvojen u zasebnu kladu, dok su ostale vrste roda *Trioxys* grupisane u istu kladu sa *Binodoxys* vrstama. U okviru ove klade izdvajaju se 3 filogenetske linije. Prva linija obuhvata dve vrste roda *Binodoxys*, *B. angelicae* (Haliday 1833) i *B. centaureae* (Haliday 1833); u drugoj se nalaze tri vrste roda *Binodoxys* (*B. acalephae*, *B. brevicornis* (Haliday 1833) i *B. heraclei* (Haliday 1833)) i jedna vrsta roda

Trioxys (*T. parauctus* Starý 1960), dok treću kladu čine dve vrste roda *Trioxys* (*T. complanatus* Quilis 1931 i *T. pallidus*) (Slika 6).



Slika 6. Filogenetski odnosi rodova *Binodoxys* i *Trioxys* analizirani na osnovu sekvenci COI gena (preuzeto iz Črkić i sar., 2019).

1.3 Morfologija, biologija, ekologija i sistematika vrsta roda *Binodoxys*

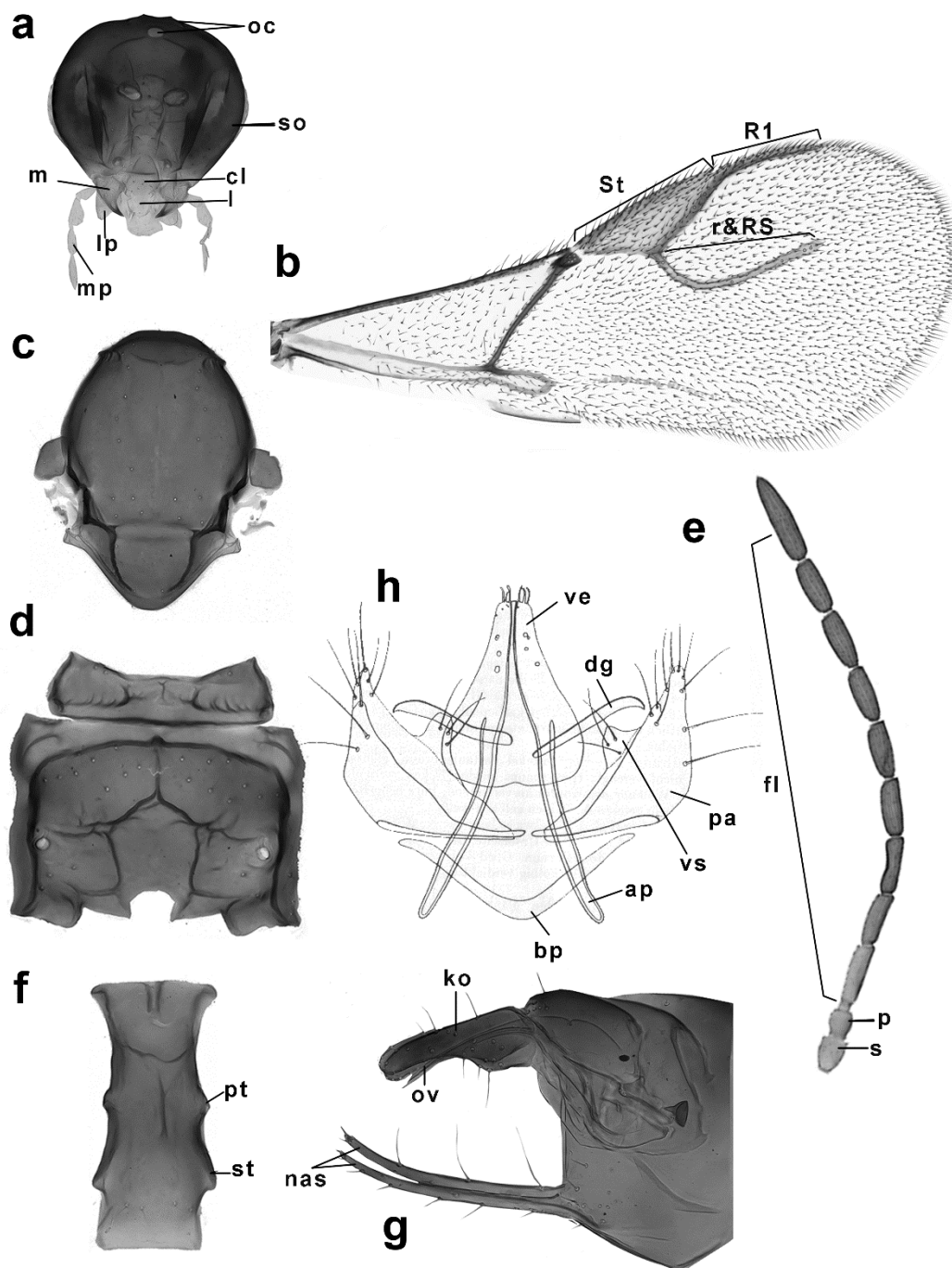
1.3.1 Morfologija vrsta roda *Binodoxys*

Rod *Binodoxys* je prvi opisao Mackauer (1959a), pri čemu je za opisivanje roda koristio vrstu *B. angelicae*. Telo je podeljeno na tri regiona: glava, grudi (mezazoma) i abdomen (metazoma). Glava je kockastog oblika i ortognatnog tipa, šira od grudi, sjajna i sa retkim

setama srednje dužine. Na glavi se nalazi par složenih očiju srednje veličine, na kojima se nalaze kratke sete. Pored složenih očiju, na glavi se nalaze i tri ocele. Usni aparat je za grickanje. Klipeus je blago konkavan sa 4 dugačke sete. Gornja usna je polu loptastog oblika sa oko 10 nepravilno postavljenih seta. Maksilarni palpusi su sa četiri segmenta, dok su labijalni palpusi izgrađeni od dva segmenta (Slika 7a). Na glavi se nalazi par končastih antena, gde se mogu razlikovati osnovni članak (*scapus*), drška (*pedicellus*) i bič (*flagellum*). Bič kod ženki je izgrađen najčešće od 9 segmenata (Slika 7e), odnosno 11 kod mužjaka.

Mezozoma je izgrađena od protoraksa, mezotoraksa, metatoraksa i prvog abdominalnog segmenta – propodeuma. Protoraks je kratak, sužava se posteriorno i nije pokriven mezoskutumom. Mezoskutum je gladak i sjajan (Slika 7c). Prednja krila sa veoma redukovanom nervaturom. Na prednjim krilima se može uočiti stigma, radijalni nerv i radijalni sektor nerv. Radijalni nerv je kraći od dužine stigme za polovinu. Radijalni sektor je zaobljen ispod stigme i postaje prav i skoro paralelan radijalnom nervu, pri čemu nestaje pri apikalnom delu radijalnog sektora (Slika 7b). Brazde dele propodeum na dve anteriorne ćelije, koje nose po četiri do osam dugačkih seta, dve posteriorne ćelije, na kojima se nalazi po jedna dugačka seta, i centralnu petougaonu ćeliju (Slika 7d).

Metazoma počinje od petiolusa, drugog abdominalnog segmenta. Petiolus je izdužen i poseduje dva para tuberkula. Prvi par tuberkula nosi spirakulume i obično je smešten iza prve trećine segmenta prema sredini petiolusa. Sekundarne tuberkule su šire, više zaobljene u odnosu na primarne tuberkule i smeštene na početku poslednje trećine petiolusa. Dorzalno na petiolusu se može uočiti centralna, uzdužna brazda i slabije izražene manje brazde (Slika 7f). Ostatak abdomena je kopljastog izduženog oblika. Poslednji sternit ženki nosi par dugačkih, skoro pravih nastavaka na kojima se nalaze tri do četiri dugačke sete sa dorzalne strane i dve blisko postavljene proste dlake na vrhu. Legalica je zakrivljena nadole (Slika 7g). Genitalije mužjaka (*aedeagus*) su građene kao i kod ostalih predstavnika familije Braconidae. Predstavnici roda *Bindoxys* imaju široke i kratke paramere na kojima se nalaze dlake različitog broja, koje su značajan taksonomski karakter. Paramere okružuju volsele na kojima se nalaze kuspis koji može da nosi različit broj dlaka, kao i digitus, na kome se nalaze zubići. Broj dlaka na kuspisu, kao i broj zubića na digitusu predstavljaju taksonomske karaktere. Unutrašnji režnjevi su srasli i obrazuju *aedeagus sensu stricto*, na čijem vrhu se nalazi otvor neparnog semevoda (Slika 7h) (nomenklatura preuzeta iz Žikić, 1999).

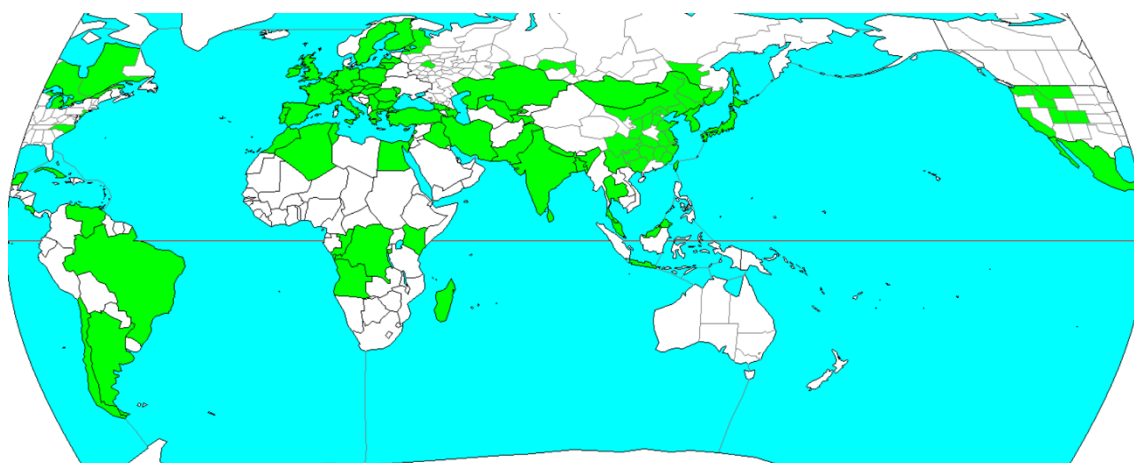


Slika 7. Morfologija vrste *B. angelicae*: a) glava, b) prednje krilo, c) mezoskutum, d) propodeum, e) antena, f) petiolus, g) legalica, h) edeagus vrste *B. genistae* (preuzeto iz Mackauer, 1960): oc – oceli, so – složene oči, cl – klipeus, l – labrum, m – mandibule, lp – labijalni palpisi, mp – maksilarni palpisi, St – stigma, R1- radijalni nerv, r&RS – radijalni sektor nerv, s – scapus, p – pedicellus, fl – flagellum, pt – primarne tuberkule, st – sekundarne tuberkule, ko – korice ovipozitora, ov – ovipozitor, nas – nastavci osmog abdominalnog

segmenta, ve – valve edeagusa, dg – digitus, vs – volsela, pa – paramera, ap – apodema edeagusa, bp – bazalni prsten.

1.3.2 Biologija i ekologija vrsta roda *Binodoxys*

Rod *Binodoxys* je rasprostranjen na skoro svim kontinentima, osim Antarktika i Australije (Slika 8). Do sada je opisano oko 70 vrsta, od čega najveći broj u Indiji, gde su opisane 22 vrste (Akhart i sar., 2011). Holartik obuhvata skoro 90% od ukupnog broja vrsta. Ispod Ekvatora opisano je samo osam vrsta: *B. achalensis* Starý 2004, *B. angolensis* (Starý & Harten 1977), *B. benoiti* (Mackauer 1959), *B. chilensis* (Starý 1995), *B. harinhalai* Starý 2005, *B. madascariensis* Starý 2005, *B. pterastheniae* (Starý & Remaudière 1977) i *B. tucumanus* (Tobias 1987) (Benoit, 1955; Starý, 1995, 2005; Starý i sar., 1977; Starý i Delphino, 1987; Delphino i Starý, 2004)



Slika 8. Istraženost faune vrsta roda *Binodoxys* u svetu (preuzeto iz Yu i sar., 2012).

U Evropi je opisano osam vrsta, *B. angelicae*, *B. acalephae*, *B. brevicornis*, *B. centaureae*, *B. genistae* (Mackauer 1960), *B. heraclei*, *B. minutus* (Haliday 1833) i *B. similis* (Macakuer 1959). Većina je panevropskog rasprostranjenja, osim *B. minutus* koji je zabeležen samo u Velikoj Britaniji i Irskoj (van Achterberg, 2013). Parazitoidi iz roda *Bindoxys* se mogu naći u zoni listopadnih šuma i stepa, ali su se delimično prilagodili i polupustinjama, visokim planinama, kao i kultivisanim predelima (parkovi, voćnjaci, njive, itd.) (Starý, 1979).

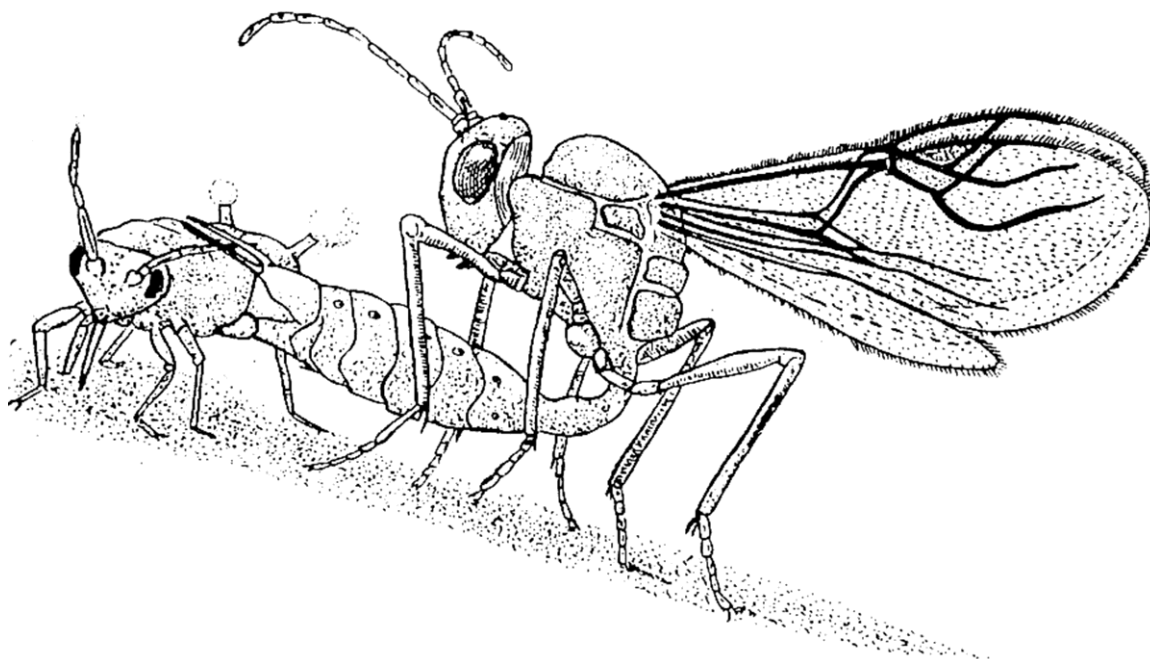
Zbog slabe istraženosti trofičkih asocijacija koje *Binodoxys* vrste grade sa biljnim vašima, za sada su samo dve vrste okarakterisane kao polifagne (*B. angelicae* i *B. indicus* (Subba Rao & Sharma 1958)). Vrsta *B. angelicae*, palearktičkog rasprostranjenja, parazitira čak 80 vrsta podfamilije Aphidinae, dok je *Binodoxys indicus* indo-malajskog rasprostranjenja i parazitira 39 vrsta biljnih vaši iz četiri podfamilije (Aphidinae, Chaitophorinae, Pemphiginae i Mindarinae) (Žikić i sar., 2017b). Sa druge strane, većina evropskih vrsta pripada grupi širokih oligofaga. U okviru oligofagne grupe najveći broj domaćina parazitira *B. aculephae* (50), *B. centaureae* (23), zatim *B. heraclei* (18), dok najmanji broj vrsta parazitira *B. brevicornis* (15). Tri evropske vrste roda *Binodoxys* zabeležene su kao monofagne; *Binodoxys genistae* parazitira vaši *Aphis genistae* Scopoli 1763, koja se hrani na biljkama roda *Genista* (Mackauer, 1960), *B. minutus* parazitira vaši koja se hrani na biljci *Buxus balearica* Lam. (O'Connor i sar., 1999), i *B. similis*, koji je parazitoid vaši *Myzus persicae* Sulzer 1776, (Fulmek, 1968; Mackauer, 1959b). Vrsta *B. brevicornis* pripada umerenim oligofagima. Parazitirajući 15 vrsta biljnih vaši iz devet rodova obrazuje 39 trofičkih asocijacija. Sve vaši pripadaju tribusu Macrosiphini, podfamilije Aphidina, osim jedne vrste vaši *Chaitophorus pakistanicus* Hille Ris Lambers 1966 koja pripada podfamiliji Chaitophorinae i koja je pronađena biljci *Salix babylonica* L. u Indiji (Bhagatt, 1984), međutim Starý (1990) navodi da je malo verovatno da je pomenuta vaš parazitirana od strane *B. brevicornis*.

Detaljni podaci o asocijacijama biljka – biljna vaš – parazitoid (tritrofičke asocijacije) za preostale četiri vrste roda *Binodoxys* za teritoriju Srbije i Crne Gore dali su Žikić i sar. (2012). Najveći broj tritrofičkih asocijacija formiraju vrste *B. angelicae* i *B. aculephae*. Prva vrsta formira 23 asocijacije, najčešće na vašima koje se hrane na biljkama porodice Rosaceae, dok druga vrsta obrazuje 10 asocijacija sa biljnim vašima najčešće sa biljaka porodice Fabaceae. Vrsta *B. centaureae* uglavnom parazitira biljne vaši koje se hrane biljkama iz porodice Asteraceae, pri čemu formira četiri trofičke asocijacije u Srbiji. *Binodoxys heraclei* obrazuje devet trofičkih asocijacija; parazitira isključivo vaši roda *Cavariella* Heinze 1960 sa vrba.

Na osnovu podataka o trofičkim asocijacijama parazitoida biljnih vaši u Srbiji i Crnoj Gori, Žikić i sar. (2012) su vrstu *B. brevicornis* zabeležili samo u Crnoj Gori. Zabeležene su dve trofičke asocijacije; parazitira vrstu iz roda *Cavariella* koja se hrani na *Pimpinella serbica* (Vis.) Benth. & Hook.f. ex Drude, dok se druga vaš, *Uhlmania singularis* (Börner, 1950) hrani na *Asperula longifolia* Sm.

1.3.2.1 Ciklus razvića vrsta roda *Binodoxys*

Kao i ostali predstavnici podfamilije Aphidiinae vrste roda *Binodoxys* su koinobiontski endoparazitoidi biljnih vaši. Nekoliko trenutaka nakon parenja ženka je u potrazi za pogodnim domaćinima u koje će položiti jaja. Nakon što detektuje domaćina, ženka pomerajući antene u vazduhu iznad proveravaju opšte fizičko i fiziološko stanje domaćina i da li su eventualno već parazitirani kako bi izbegla superparazitizam. Nakon odabira domaćina ženka ga prihvata prednjim nogama i viljuškastim nastavcima na abdomenu koji se izdužuje i savija ispod njenog tela kako bi isturila legalicu i parazitirala (Slika 9) Ženke obično polažu jaja u II ili III stupanj nimfe domaćina (Mackauer, 1959a).



Slika 9. Parazitiranje vaši od strane vrste roda *Binodoxys* (preuzeto iz Mackauer, 1959a).

1.3.3 Sistematika, morfologija, biologija i distribucija evropskih vrsta roda

Binodoxys

1.3.3.1 *Binodoxys angelicae*

Aphidius (Trioxys) angelicae Haliday 1833

Aphidius acalephae Marshall 1896

Trioxys palcidus Gautier 1922

Trioxys boscai Quilis 1931

Trioxys fumariae Quilis 1931

Trioxys granatensis Quilis 1931

Trioxys obscuriformis Quilis 1931

Trioxys amoplanus Quilis 1934

Trioxys (Trioxys) rietscheli Mackauer 1959

Trioxys (Trioxys) urticae Mackauer 1959

Trioxys (Trioxys) angelicae mediterraneus Mackauer 1960

Trioxys wollastonii Cabrera 1962

Jedinke *B. angelicae* su najčešće braon do tamno braon boje. Svetlije boje su delovi usnog aparata (žučkaste boje), skapus, pedicel i prvi segment biča antena su žuto-braon boje, kuk (*coxa*) i butni valjak (*trochanter*) su žučkaste, vrh terminalnog abdominalnog sternita, kao i parni nastavci poslednjeg abdominalnog sternita su žute boje.

Veličina tela ženki se kreće od 1,3 do 2 mm, dok su mužjaci sitniji, odnosno veličina tela se kreće od 1,3-1,5 mm (Mackauer, 1959a, Mescheloff i Rosen, 1993).

Vrsta je široko rasprostranjena širom Palearktika, pri čemu je introdukovana i u Burundi (Antrique i sar., 1989) i Kaliforniju (SAD) (Fleschner, 1963). Van Achterberg (2013) je na osnovu prikupljenih podataka napravio mapu distribucije vrste u Evropi, gde je vrsta zabeležena pre svega u zapadnom i centralnom delu Evrope, ali se javlja i u pojedinim državama istočne Evrope. Vrsta je verovatno rasprostranjena u čitavoj Evropi (Slika 10).



Slika 10. Istraženost vrste *B. angelicae* u Evropi (preuzeto iz van Achterberg, 2013).

1.3.3.2 *Binodoxys acalephae*

Aphidius acalephae Marshall 1896.

Trioxys amoplanus Quilis 1934

Trioxys (Trioxys) rietscheli Mackauer 1959.

Trioxys (Trioxys) urticae Mackauer 1959.

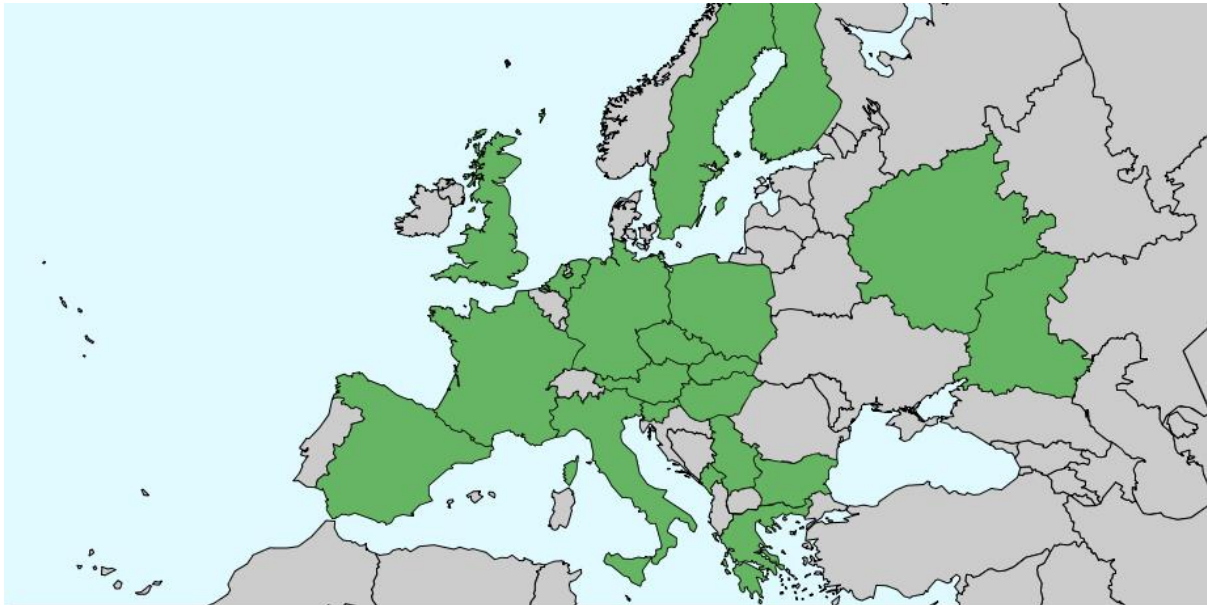
Glava je crna, malo šira od mezozome. Mandibule i palpisi žuto obojeni. Antene su žuto-braon boje, izgrađene od 11 segmenata kod ženki, odnosno 13 kod mužjaka. Segmenti se prema vrhu sužavaju, poslednji, apikalni segment je skoro dvostruko duži od preposlednjeg, preapiakalnog segmenta. Prva dva flagelarna segmenta su svetlije obojena.

Mezozoma je tamno braon do crna Propodeum je ponekad svetlije obojen i na njemu se može uočiti centralna petougona ćelija. Na prednjim krilima se može uočiti redukovana nervatura braon boje. Noge su tamno braon, pri čemu su kukovi sva tri para nogu, but (*femur*) i golen (*tibia*) srednjih i zadnjih nogu kompletno ili delimično crne.

Metazoma je crne boje, ali je petiolus svetlije oboje. Na petiolusu se jasno uočavaju primarne i sekundarne tuberkule, pri čemu je širina petiolusa u nivou primarnih tuberkula veća od distance između primarnih i sekundarnih tuberkula. Nastavci osmog abdominalnog sternita su svetlije obojeni i nose po četiri dorzalne sete i dve apikalne (Mackauer, 1959a).

Veličina tela se kreće od 1,2-1,8 mm kod ženki, dok su mužjaci sitniji (1,0-1,6 mm).

Rasprostranjena je u Holarktiku, pre svega u Evropi (Slika 11), ali se javlja i u Kanadi, Kini, Kazahstanu, Mongoliji, Maroku, Uzbekistanu, Tadžikistanu, kao i azijskom delu Rusije (Yu i sar., 2012), dok je introdukovana u Burundi (Antrique i sar., 1989).



Slika 11. Istraženost vrste *B. aculephae* u Evropi (preuzeto iz van Achterberg, 2013).

1.3.3.3 *Binodoxys brevicornis*

Aphidius (Trioxyis) brevicornis Haliday 1833

Aphidius (Trioxyis) minutus Haliday 1833

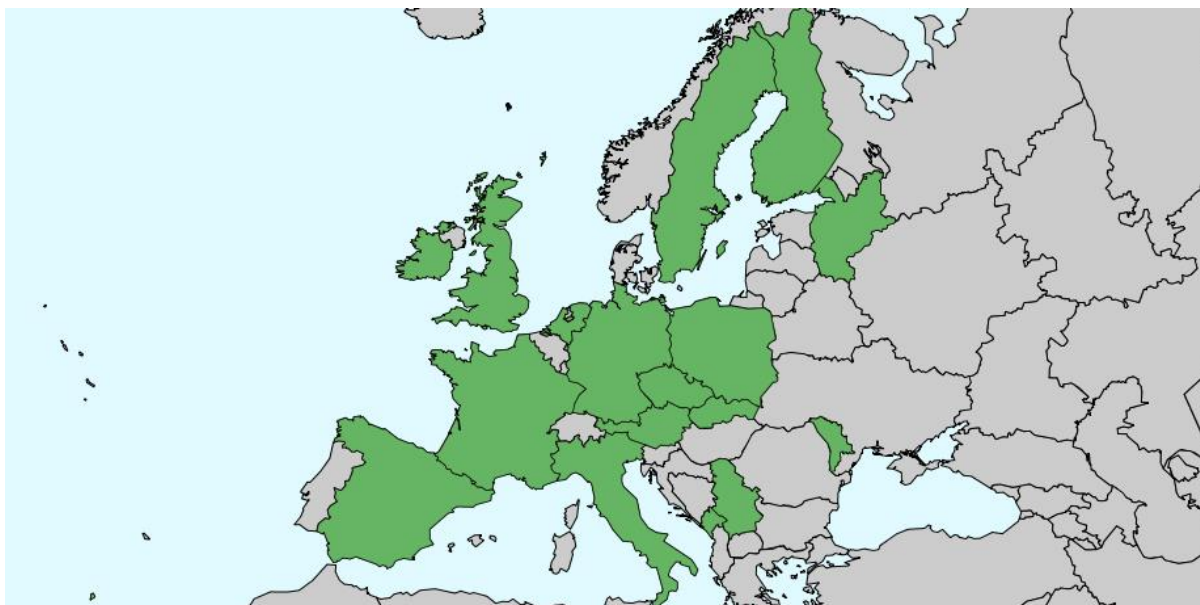
Na klipeusu se nalazi 5 dugačkih seta; labrum je trouglast i nosi 16 dugačkih seta. Flagelum je izgrađen iz osam segmenata kod ženki, odnosno deset kod mužjaka.

Mezoskutum nosi 17-25 pleuralnih seta (Tremblay, 1975; Zumofen i sar, 2013). Propodeum je gladak ili sa dve uzdužne brazde i nosi 8-10 seta. Krila su hijalinska sa braon obojenim nervima. Radijalni nerv je jedva duži od širine stigme (Mackauer, 1960a).

Petiolus je kratak; primarne tuberkule su vidljive, dok su sekundarne tuberkule pozicionirane veoma blizu spirakularnih. Nastavci su ravni do lučno savijeni prema ovipozitoru i sužavaju se prema vrhu. Na nastavcima se nalazi 3-4 dorzalnih seta (Zumofen i sar., 2013).

Veličina tela 1,5-1,7 mm kod ženki, odnosno 1,4 mm kod mužjaka (Mackauer 1959a).

Rasprostranjena je duž nekoliko klimatskih pojaseva, od hladnog na severu, preko umerenog ili toplih obalskih klimata, kontinentalne klime do polupustinja. Sekundarno je prilagođena na tropski klimat. Rasprostranjena je u Evropi (Slika 12), severnoj Africi i zapadnoj i centralnoj Aziji (Starý, 1990, Yu i sar., 2012, van Achterberg 2013). Kao rezultat slučajne introdukcije, ova vrsta je zabeležena još u Venecueli (Starý i Cermeli, 1989) i Argentini (Zumofen i sar., 2013). U svrhu biološke kontrole *Brachycorynella asparagii* (Mordvilko 1928), introdukovana je u Kaliforniju (SAD) (Starý, 1990).



Slika 12. Istraženost vrste *B. brevicornis* u Evropi (preuzeto iz van Achterberg, 2013).

1.3.3.4 *Binodoxys centaureae*

Aphidius (Trioxys) centaureae

Trioxys (Binodoxys) orientalis Starý & Schlinger 1967

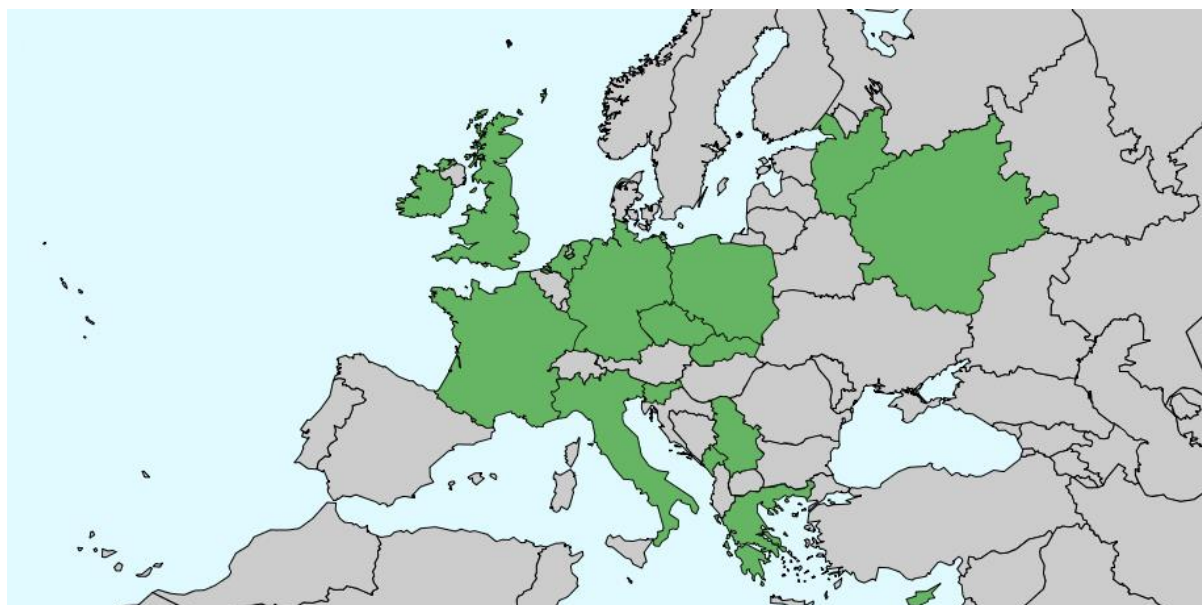
Binodoxys uroleucon Takada & Rishi 1980

Glava je kestenjasta do braon. Usni aparat je svetlije obojen. Antene oba pola su izgrađene od jedanaest segmenata, pri čemu su kod ženki prva tri svetlije obojena.

Stigma je braon, dva puta duža od dužine radijalnog nerva. Propodeum je sa jasno uočljivom centralnom petougastom ćelijom. Spirakularne tuberkule na petiolusu su postavljene skoro na njegovoj sredini; nakon čega se petiolus širi prema sekundarnim tuberkulama, koje su pozicionirane u poslednjoj trećini petiolusa. Kopulatorni nastavci na dorzalnoj strani imaju 7-8 dugačkih seta.

Veličina tela se kreće od 1,9-2,6 mm (Mackauer 1959a).

Rasprostranjena je od Mediterana na jugu, preko umerenog klimata srednje Evrope do skandinavskog poluostrva, gde je Mackauer (1959a) zabeležio prisustvo u Švedskoj (Slika 13). Pošto su pronađeni primerci vrste i u sibirskom delu Rusije (Davidian 2007), Kini (Starý, 1979), kao i u Indiji (Dey i Akhart, 2007), Japanu (Starý i Schlinger, 1967), Koreji (Starý i Choi, 2000), Tadžikistan (Fulmek, 1968), Uzbekistan (Aripov, 2003) pretpostavlja se da vrsta ima Palearktčko i Orijentalno rasprostranjenje.



Slika 13. Istraženost vrste *B. centaureae* u Evropi (preuzeto iz van Achterberg, 2013).

1.3.3.5 *Binodoxys heraclei*

Aphidius (Trioxys) heraclei Haliday 1833

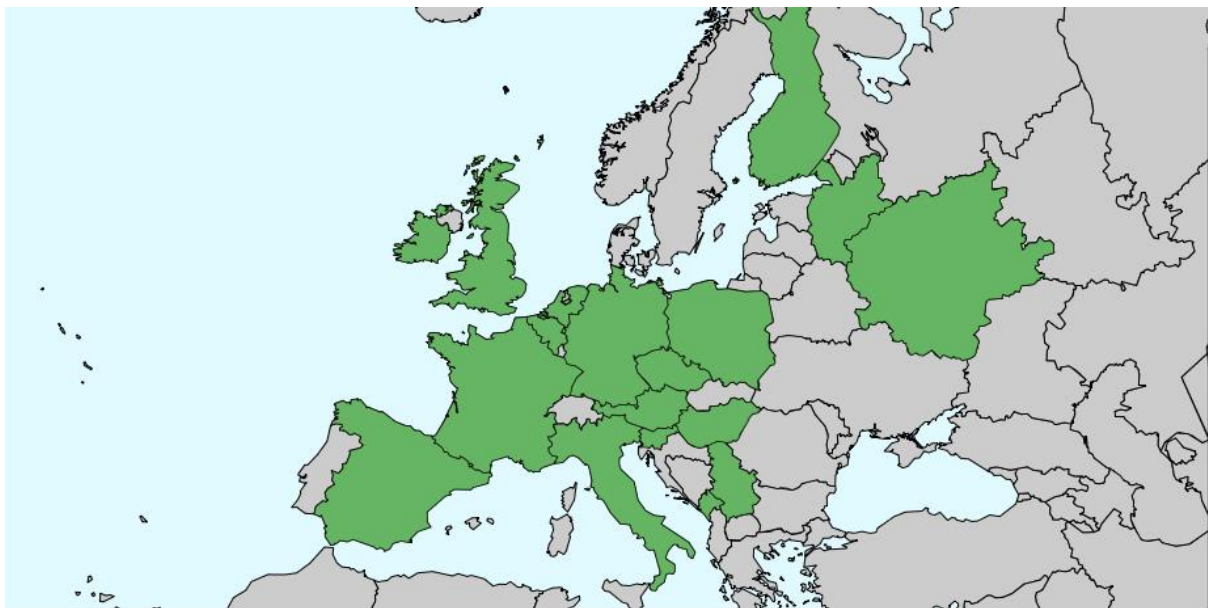
Aphidius (Trioxys) letifer Haliday 1833

Aphidius obselutus Wesmael 1835

Trioxys variegator Szèpligeti 1898

Kod ženki glava je tamno braon do crna; ispod antena lice, klipeus i usni aparat su žuti, dok su kod mužjaka samo mandibule žute boje. Antene su izgrađene od 11 segmenata kod ženki, odnosno 13 kod mužjaka. Mezozoma je svetlije ili tamnije braon obojena. Na propodeumu je jasno uočljiva centralna petougaona ćelija. Krila su sa braon nervaturom. Na petiolusu uočljive primarne i sekundarne tuberkule. Na viljuškastim nastavcima poslednjeg abdominalnog sternita kod ženki se nalaze 3-4 dugačke, dorzalne sete.

Veličina tela se kreće od 1,6-1,9mm i kod mužjaka i kod ženki (Mackauer 1959a).



Slika 14. Istraženost vrste *B. heraclei* u Evropi (preuzeto iz van Achterberg, 2013).

Vrsta je zabeležena širom Evrope (Slika 14), ali je pronađena i u Iranu (Rakshani, 2007), Tadžikistanu (Sary, 1979) i Nepal (Todorov, 2009).

1.3.3.6 *Binodoxys similis*

Trioxyys (Trioxyys) similis Mackauer 1959

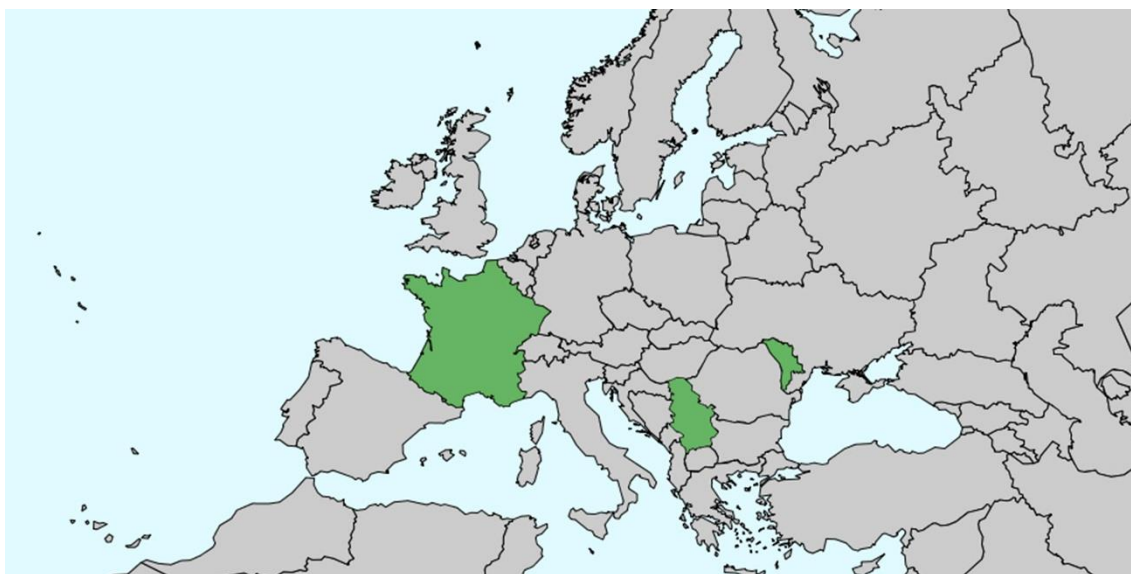
Glava kestenjasta do crna, znatno šira od mezozome. Klipeus je braon sa gustim dlakama. Mandibule i palpusi su svetložuti. Antene kod ženki izgrađene su od 11 segmenata. Prva tri segmenta i polovina četvrtog su svetlije obojeni, dok su ostali segmenti tamno-braon boje. Antene mužjaka su izgrađene od 13 segmenata.

Na propodeumu je moguće uočiti centralnu ćeliju koja nije zatvorena. Nervatura krila je svetlo-braon.

Abdomen braon boje. Na petiolusu se mogu uočiti primarne i sekundarne tuberkule. Spirakularne tuberkule su pozicionirane malo iznad polovine segmenta. Širina petiolusa u nivou primarnih tuberkula je gotovo identična širini u nivou sekundarnih tuberkula. Nakon sekundarnih tuberkula petiolus se sužava. Na parnim nastavcima legalice može se uočiti 5-6 dorzalnih dlaka.

Dužina tela ženki varira od 1,5-1,8 mm, dok su mužjaci nešto sitniji, odnosno veličina tela se kreće od 1,2 do 1,6 mm (Mackauer, 1959b).

Vrsta je rasprostranjena samo u Evropi, pri čemu po podacima Yu i sar. (2012) vrsta se može naći u Francuskoj, Moldaviji i Srbiji (Žikić et al 2012) (Slika 15).

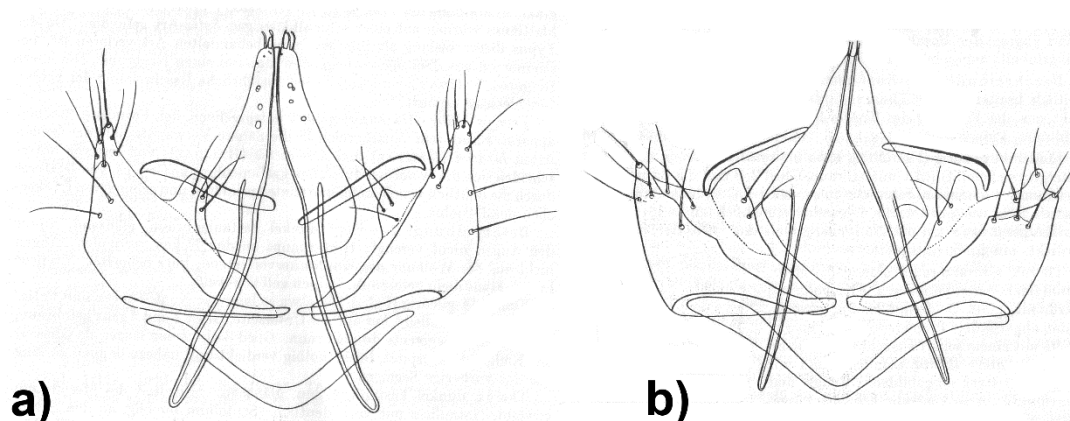


Slika 15. Istraženost vrste *B. similis* u Evropi (preuzeto iz van Achterberg, 2013), dopunjeno (Žikić i sar.,2017b).

1.3.3.7 *Binodoxys genistae*

Trioxys (Binodoxys) genistae Mackauer 1960

Mackauer (1960) je vrstu *B. genistae* opisao na osnovu mužjaka, ali su pored morfoloških uočene i razlike u obojenosti tela. Jedinke vrste *B. genistae* su uniformno braon obojene, za razliku od pripadnika vrste *B. similis*. Naime, ženke ove vrste su morfološki veoma slične *B. similis*. Jedino po čemu se pomenute dve vrste razlikuju je morfologija edeagusa, tačnije broj dlaka na kuspisima volsela i paramerama. Mužjaci vrste *B. genisate* na kuspisima nose tri dlake, za razliku od pripadnika *B. similis* kod kojih se nalaze dve dlake. Na vrhovima paramera se nalazi po devet dlaka, odnosno kod *B. similis* šest (Slika 16).



Slika 16. Morfologija muškog polnog organa kod: a) *B. genistae* i *B. similis* (preuzeto iz Mackauer, 1960).

Glava je tamno braon, neznatno šira od mezozome. Klipeus je crn, mandibule braon, dok su palpusi svetlije obojeni. Antene su tamne, osim drugog segmenta koji je žuto obojeni. Broj segmenata je 11 kod ženki i 13 kod mužjaka.. Dužina antena je jednaka dužini glave, grudi i petiolusa zajedno.

Mezozoma je crna. Na propodeumu je uočljiva petougaona centralna ćelija. Nervatura krila je tamnobraon. Noge su tamnobraon, osim zglobova koji su svetlije boje.

Metazoma tamno-braon do crna. Na petiolusu su uočljive primarne i sekundarne tuberkule (Slika 18). Petiolus je tamno obojen, osim posteriornog dela koji je svetlo-braon. Legalica je crna. Parnim nastavci nose pet dorzalnih dlaka srednje dužine.

Dužina tela se kreće od 1,5-2,2 mm (Mackauer, 1960a).

Vrsta je zabeležena u svega pet država Evrope (Bugarska, Češka, Francuska, Nemačka, Slovačka i Švajcarska) (Slika 17), kao i u Primorskoj oblasti Rusije (Davidian, 2007).



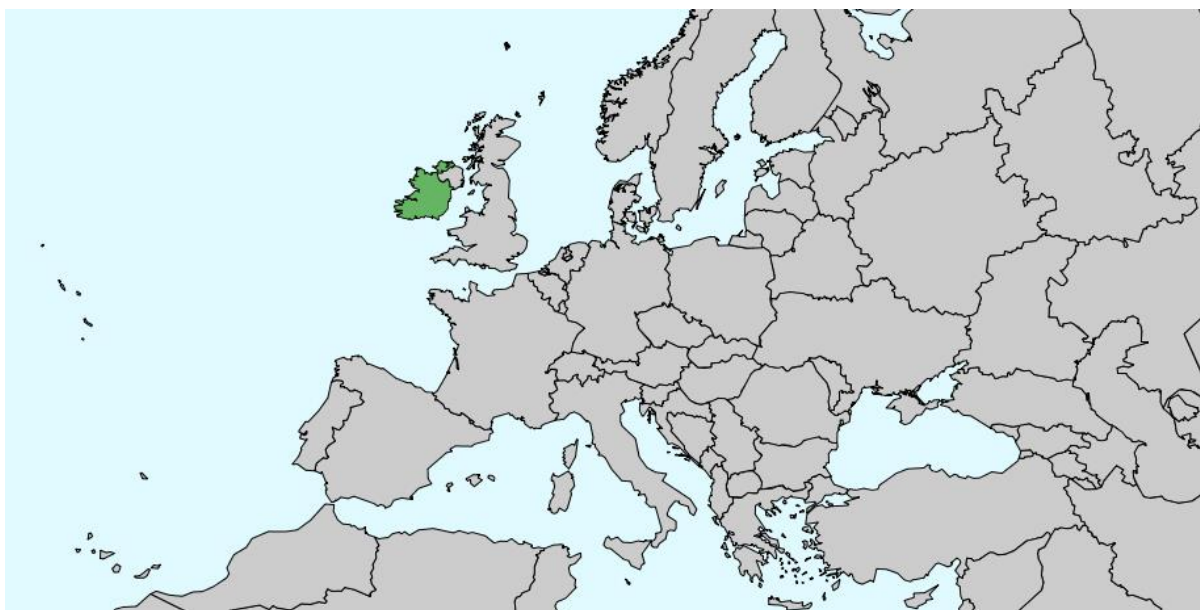
Slika 17. Istraženost vrste *B. genistae* u Evropi (preuzeto iz van Achterberg, 2013).

1.3.3.8 *Binodoxys minutus*

Aphidius (Trioxys) minutus Haliday 1833

Morfološki je veoma slična vrsti *B. brevicornis*. Jedina razlika je u broju segmenata antena. Naime, kod pripadnika vrste *B. minutus*, Haliday (1833) uočava 11 segmenata, dok je za vrstu *B. brevicornis* karakteristično da su kod ženki antene izgrađene od 10 segmenata. Kako je tipski materijal za ovu vrstu izgubljen, Mackauer (1959a) navodi da je moguće da se radi o sinonimu vrste *B. brevicornis*.

Vrsta je rasprostranjena samo u Irskoj (Slika 18).



Slika 18. Istraženost vrste *B. minutus* u Evropi (preuzeto iz van Achterberg, 2013).

1.4 Molekularni markeri korišćeni u analizama podfamilije Aphidiinae

Krajem prošlog veka počeli su da se sekvencioniraju DNK fragmenti, koji su korišćeni za identifikaciju vrsta i utvrđivanje odnosa unutar određenih taksonomskih kategorija. Podfamilija Aphidiinae je često analizirana molekularnim metodama. Od devedesetih godina prošlog veka, kada su Belshaw i Quicke (1997) analizirali odnose u okviru podfamilije Aphidiinae kreće ekspanzija upotrebe različitih molekularnih markera za analizu.

U molekularnim analizama podfamilije Aphidiinae korišćeni su i jedarni i mitohondrijski geni. Od jedarnih gena najčešće je korišćen 28S koji je informativan za razjašnjavanje filogenetskih odnosa tribusa, podfamilija i familija (Belshaw i Quicke, 1997).

Sa druge strane, veći broj mitohondrijskih gena je korišćen: 16S, 18S, elongacioni faktor α i drugi (Sanchis i sar., 2000; Shi i Chen, 2005; Derocle i sar., 2012, 2016). DNK sekvenca za citohrom oksidazu subjedinicu I (COI) je najčešće korišćeni mitohondrijski marker za analizu odnosa unutar podfamilije Aphidiinae. Koristeći kratke segmente ovog gena, tzv. DNA *barcoding*, moguća je identifikacija jedinki kako na nižim, tako i na višim taksonomskim kategorijama. Stoga, ne čudi što je korišćen za razjašnjavanje odnosa u okviru podfamilije Aphidiinae (Žikić i sar., 2017a), ali i za otkrivanje kriptičnih vrsta (Derocle i sar., 2016; Ye i sar., 2017; Tomanović i sar., 2018). U nekim slučajevima (npr., muzejski primerci) izolacija

pomenutog dela genoma nije moguća primenom standardnih prajmera, zbog čega u poslednjih nekoliko godina se krenulo sa razvijanjem novih prajmera (Mitrović i Tomanović, 2018).

1.5 Primena geometrijske morfometrije u taksonomskim analizama pripadnika podfamilije Aphidiinae

Pored tradicionalnog morfometrijskog pristupa u taksonomskim studijama, sve češća je primena geometrijske morfometrije koja se zasniva na analizama veličine i oblika morfoloških struktura na osnovu konfiguracije specifičnih tačaka. Pored toga što geometrijska morfometrija omogućava vizuelizaciju odnosno grafičko prikazivanje promena oblika (Zelditch i sar., 2012), ona može detektovati veoma male promene u obliku analiziranih struktura (Klingenberg, 2002).

Pored toga, primenom geometrijske morfometrije moguće je razdvojiti alometrijsku od nealometrijske komponente morfološke varijabilnosti. Kod većine organizama sa povećanjem veličine dolazi do promene oblika strukture i tada govorimo o alometrijskim promenama oblika (Klingenberg, 2016). Postoji nekoliko tipova alometrije (ontogenetska, statička i evolucionarna), pri čemu evolucionarna alometrija opisuje promene oblika uslovljene promenom veličine tokom evolucionarne istorije grupe (Klingenberg, 1998).

Geometrijska morfometrija često primenjena metoda za objašnjavanje razlika u morfologiji krila na različitim taksonomskim nivoima podfamilije Aphidiinae. Razlike u obliku i nervaturi krila između tribusa podfamilije Aphidiinae analizirane su od strane Žikić i sar. (2017a), gde je uočeno da je nervatura krila u većini slučajeva taksonomski karakter, osim u tribusima Aphidiini i Trioxini gde se javljaju različiti stepeni redukcije nervature krila. Ilić Milošević i sar. (2015) su analizirali taksonomski status tri roda (*Aphidius*, *Euaphidius* Mackauer 1961 i *Remaudierea* Starý 1973), te su putem geometrijske morfometrije krila i molekularnim analizama utvrdili da se radi o rodu- *Aphidius*.

Takođe, geometrijska morfometrija se može koristiti za razlikovanje blisko srodnih vrsta, odnosno kompleksa vrsta. Tako su Stanković i sar. (2015), na osnovu geometrijske morfometrije prednjih krila i molekularnih analiza jasno izdvojili tri vrste roda *Adialytus* koje naseljavaju Evropu. Mitrovski-Bogdanović i sar. (2014) u okviru *Praon dorsale yomenae*

kompleksa na osnovu morfologije krila izdvojili *P. dorsale*, *P. longicorne*, *P. megourae*, *P. volucre* i *P. yomenae*.

Parreño i sar. (2017) su primenom ove metode na prednjim krilima vrste *Lysiphlebus fabarum* (Marshall 1896) izdvojili pet filogenetskih linija sa različitih domaćina. Sličnu studiju sproveli su i Villegas i sar. (2017), gde su potvrdili da postoje morfološke razlike u obliku i veličini krila vrste *Aphidius ervi* Haliday 1833 sakupljenih sa osam različitih biotipova. Metodom geometrijske morfometrije detektovana je i razlika u obliku i veličini aseksulane i seksualne linije vrste *Lysiphlebus fabarum* (Žikić i sar., 2014).

2 Ciljevi istraživanja

Osnovni ciljevi ove studije su:

1. Analiziranje razlika u morfologiji krila blisko srodnih rodova *Binodoxys* i *Trioxys*
2. Utvrđivanje morfološke varijabilnosti krila i petiolusa unutar roda *Binodoxys* primenom geometrijske morfometrije
3. Utvrđivanje filogenetskih odnosa između evropskih vrsta roda *Binodoxys* na osnovu mitohondrijskog COI gena
4. Ispitivanje da li filogenetski srodne vrste pokazuju slične morfološke obrasce
5. Analiziranje morfoloških struktura skening elektronskom i svetlosnom mikroskopijom
6. Revizija evropskih vrsta roda *Binodoxys*
7. Izrada ključa za identifikaciju evropskih vrsta roda *Binodoxys*

3 Metodologija

3.1 Sakupljanje materijala

U studiji morfoloških razlika između rodova *Binodoxys* i *Trioxys* analizirano je četiri vrste roda *Binodoxys* (*B. acalephae*, *B. angelicae*, *B. brevicornis* i *B. heracle*) i dve vrste roda *Trioxys* (*T. complanatus* Quilis Perez 1931 i *T. pallidus*) (Tabela 1), dok je za razjašnjavanje morfoloških razlika između vrsta roda *Binodoxys* analizirano šest evropskih vrsta roda *Binodoxys*: *B. acalephae*, *B. angelicae*, *B. brevicornis*, *B. centaureae*, *B. heraclei* i *B. similis* (Tabela 2). Ostale dve evropske vrste (*B. genistae* i *B. minutus*) nisu obuhvaćene analizom, zbog nedostatka materijala. Jedinke su sakupljene u periodu od 1990. do 2015. godine na teritoriji nekoliko evropskih država (Austrija, Belgija, Crna Gora, Slovenija, Srbija i Švedska) (Tabele 1 i 2). Uzorci su sakupljeni odsecanjem delova biljaka na kojima su se hranile biljne vaši i stavljanjem istih u plastične čaše zapremine 0,5 litara koje su pokrivene rastegljivom tkaninom, kako bi se sprečio izlazak domaćina, kao i parazitoida ukoliko su biljne vaši parazitirane. Ovako sakupljeni uzorci čuvani su dve do tri nedelje na temperaturi od 24 °C i relativnoj vlažnosti od 65%. Nakon eklozije, parazitske ose su sakupljene finom četkicom i stavljene u flakone sa 96% etil-alkoholom zapremine 1 µl.

Tabela 1. Spisak uzoraka korišćenih u analizi prednjih krila vrsta rodova *Binodoxys* i *Trioxys*.

Rod parazitoida	Vrsta parazitoida	Lokalitet, datum, biljka, vaš i legator	Br. krila
<i>Binodoxys</i>	<i>B. acalephae</i>	Srbija, Niš, Popovac, 04.07.2012, <i>Vicia cracca</i> , <i>Aphis craccae</i> , VŽ	14
	<i>B. angelicae</i>	Srbija, Sićevačka klisura, 12.05.2013, <i>Sambucus nigra</i> , <i>Aphis sambuci</i> , VŽ	15
	<i>B. brevicornis</i>	Crna Gora, Durmitor, Crno jezero, 25.07.2012, Apiaceae, <i>Hyadaphis foeniculi</i> , VŽ	10
	<i>B. heraclei</i>	Srbija, Dukat mt, 29.06.2012, <i>Aegopodium</i> sp., <i>Cavariella theobaldi</i> , VŽ	11
<i>Trioxys</i>	<i>T. complanatus</i>	Srbija, Smederevo, Malo Orašje, 10.06.2012.,	14
	<i>T. pallidus</i>	Srbija, Kruševac, 19.05.2013, ZK	14

3.2 Geometrijska morfometrija

3.2.1 Priprema materijala geometrijsku morfometriju

Kako bi se obradili delovi tela osa koji su korišćeni u morfometrijskim analizama, ženke su disekovane. Naime, svaka jedinka je stavljana u destilovanu vodu gde su prvo krila pažljivo odvojena, a u slučaju vrste roda *Binodoxys* petiolus. Nakon disekcije, delovi tela korišćeni u analizama geometrijske morfometrije su lepljeni za mikroskopske pločice Berlezovim medijumom. Tako pripremljeni preparati su ostavljeni nekoliko dana da se osuše, a zatim je stavljen još jedan sloj medijuma i pokrovno staklo. Nakon toga su preparati slikani u laboratoriji Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Krila su slikana na Leica mikroskopu DM2500 kamerom Leica DFC490 na uveličanju 50x, dok su petiolusi slikani na Leica binokularu DFC 320 (M2 16A) na uveličanju 115x. Uzorci korišćeni u morfometrijskim analizama prikazani su u Tabeli 2.

Tabela 2. Spisak uzoraka *Binodoxys* vrsta korišćenih u analizama geometrijske morfometrije krila i petiolusa. Skraćenice za države: BEL= Belgija, MNE = Crna Gora, SRB = Srbija, SLO = Slovenija, SWE = Švedska. Skraćenice za legatore: ML = M. Lazarević, SSS = S. S. Stanković, ZK = Z. Kojičić, VŽ = V. Žikić, ŽT = Ž. Tomanović.

Parazitoid	Lokalitet, datum, biljka, vaš i legator	Br. petiolusa	Br. krila
<i>B. aculephae</i>	SRB, Niš, 23.06.2013, <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Aphis craccivora</i> , VŽ	2	10
	SRB, Kula, 10.07.2011, <i>Amaranthus retroflexus</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , ŽT	5	5
	SRB, Niš, Popovac, 04.07.2012, <i>Vicia cracca</i> , <i>Aphis cracciae</i> , VŽ	2	9
	SRB, Sićevačka klisura, 22.04.2014, <i>Urtica dioica</i> , <i>Aphis urticata</i> , VŽ	4	6
	SRB, Kruševac, Bagdala, 05.07.2012, <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Aphis craccivora</i> , ZK	5	11
	SRB, Sićevačka klisura, Ravni do, 29.05.2014, <i>Galium verum</i> , <i>Staegeiriella necopinta</i> , VŽ	8	14
	MNE, Durmitor, 27.08.1991, <i>Euphorbia myrsinites</i> , <i>Aphis</i> sp., ŽT	1	0
	BEL, VIRIDAXIS, <i>Epilobium hirsutum</i> , <i>Aphis grossulariae</i>	1	1
	SRB, Vlasinsko jezero, 16.06.2011, <i>Salix fragilis</i> , <i>Pterocomma</i> sp., VŽ.	1	0
Ukupno		29	56
<i>B. angelicae</i>	SRB, Niš, 08.10.2010, <i>Solanum nigrum</i> , <i>Aphis fabae</i> , VŽ	11	10
	SRB, Lebane, 01.06.2013, <i>Chenopodium album</i> , <i>Aphis</i> sp., SSS	8	10
	SRB, Niš, Niška banja, 06.06.2013, <i>Tamarix</i> sp.1, <i>Brachyungius tamaricis</i> , VŽ	0	9

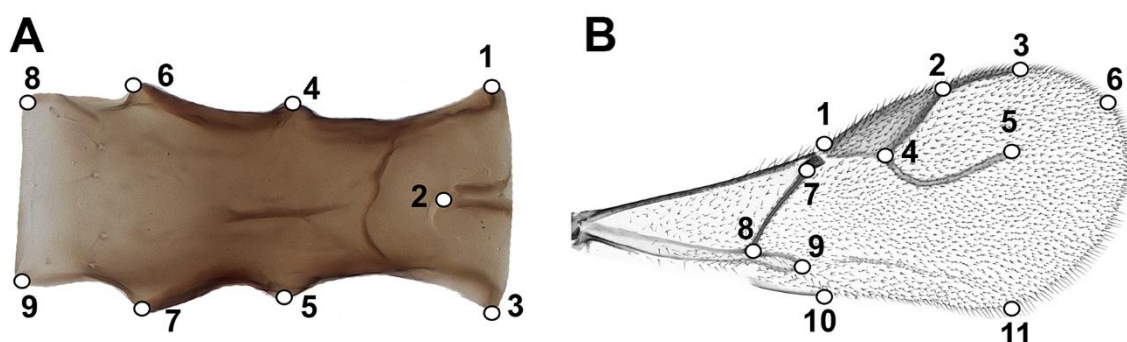
Nastavak tabele

Parazitoid	Lokalitet, datum, biljka, vaš i legator	Br. petiolusa	Br. krila
B. angelicae	SRB, Niš, Trošarina, 04.04.2014, <i>Rumex acetosa</i> , <i>Aphis fabae</i> , VŽ.	5	11
	SRB, Kruševac, Donji Stepoš, 17.05.2015, <i>Philadelphus coronarius</i> , <i>Aphis</i> sp., ML	7	10
	BEL, Gingelom, 22.05.2015., <i>Silene latifolia</i> , <i>Brachycaudus lychnidis</i>	1	1
	SRB, Belgrade, Botanical Garden, 16.04.2007, <i>Sambucus nigra</i> , <i>Aphis sambuci</i> , ŽT	1	1
	SRB, Radmilovac, 31.05.2013, <i>Sambucus nigra</i> , <i>Aphis sambuci</i> , ŽT	1	1
	SLO, Bohinj, 16.07.2014, <i>Epipactis</i> sp., <i>Aphis epipactis</i> , ŽT	1	1
	SRB, Niš, Vrežina, 11.06.2011, <i>Tanacetum vulgare</i> , <i>Uroleucon</i> sp., VŽ	1	1
	SWE, Uppsala, Genetic centrum, 02.07.2014, <i>Malus domestica</i> , <i>Aphis pomi</i>	1	0
	SRB, Vlasinsko jezero, 16.06.2011, <i>Salix fragilis</i> , <i>Pterocomma</i> sp., VŽ.	1	0
Ukupno		38	55
B. brevicornis	MNE, Durmitor, Crno jezero, 25.07.2012, Apiaceae, <i>Hyadaphis foeniculi</i> , VŽ.	4	17
	MNE, Durmitor, Crno jezero, 25.07.2012, <i>Asperula cynanchica</i> , <i>Uhlmania singularis</i> , ŽT	6	11
	MNE, Durmitor, Sušica, 27.07.2012, <i>Sanicula europaea</i> , <i>Hyadaphis foeniculi</i> , VŽ	2	0
	Ukupno	12	28
B. centaureae	SRB, Beljanica, Suvaja, 01.08.1996, <i>Mycelis muralis</i> , <i>Uroleucon murale</i> , VŽ.	3	3
	SLO, Paljevo, 02.06.2011, <i>Crepis biennis</i>	1	3
	SRB, Niš, G. Matejevac, 16.06.2015, <i>Centaurea</i> sp., <i>Uroleucon</i> sp., VŽ	8	16
	Ukupno	12	22
	B. heraclei	SRB, Dukat mt, 29.06.2012, <i>Aegopodium</i> sp., <i>Cavariella theobaldi</i> , VŽ.	5
B. heraclei	SRB, Niš, Sićevačka klisura 15.06.2013, <i>Pastinaca</i> sp., <i>Cavariella</i> sp., VŽ	0	1
	MNE, Šavnik, 07.08.2013, <i>Pastinaca</i> sp., <i>Cavariella aegopodii</i> , VŽ	3	1
	SRB, Divčibare, 12.08.2000, Apiaceae, <i>Cavariella theobaldi</i> , ŽT	6	0
	Ukupno	14	15
	B. similis	BEL, VIRIDAXIS	4
B. similis	BEL, VIRIDAXIS, 02.09.2015., <i>Epilobium hirsutum</i> , <i>Aphis</i> sp.	2	1
	Ukupno	6	9
Ukupno		111	185

3.2.2 Izbor specifičnih tačaka

Geometrijska morfometrija se zasniva na analizama konfiguracija specifičnih tačaka (*landmarks* - LM) koje opisuju oblik date morfološke strukture. Specifične tačke predstavljaju jasno definisana anatomska mesta koja mogu biti prepoznata na svim morfološkim celinama unutar analiziranog uzorka (Zelditch i sar., 2012).

Kao predmet analize izabrane su dve morfološke strukture – petiolus i krilo. U ovoj studiji, petiolus je prvi put upotrebljen kao predmet istraživanja u geometrijskoj morfometriji. Kako se radi o bilateralno simetričnoj strukturi, definisano je devet specifičnih tačaka, pri čemu su četiri tačke bilateralno simetrično, dok je jedna tačka postavljena medijalno. Tačke 1, 2 i 3 označavaju anteriorni kraj petiolusa, 4 i 5 predstavljaju položaj primarnih tuberkula, 6 i 7 označavaju sekundarne tuberkule, dok 8 i 9 definišu posteriorni kraj petiolusa (Slika 19A).



Slika 19. Prikaz petiolusa (A) i krila (B) vrste *B. angelicae* sa odabranim specifičnim tačkama.

Na krilnoj ploči vrsta roda *Binodoxys* sa veoma redukovanom nervaturom, definisano je 11 specifičnih tačaka (Slika 19B, Tabela 3). Za postavljanje specifičnih tačaka za obe strukture korišćen je softver tpsDig2 (Rohlf, 2005).

Tabela 3. Spisak odabranih specifičnih tačaka na krilnoj površini.

LM1 – početak stigme

LM2 – kraj stigme i početak radijalnog nerva (R1)

LM3 – završetak radijalnog nerva (R1)

- LM4 – početak nerva radijalni sektor (r&Rs)
- LM5 – završetak nerva radijalni sektor (r&Rs)
- LM6 – projekcija nerva radijalni sektor (r&Rs) na obod krila
- LM7 – početak prvog medijalnog nerva (1M)
- LM8 – završetak prvog medijalnog nerva (1M)
- LM9 – početak trećeg kubitalnog nerva (3Cu) i projekcije prvog analnog nerva (1A)
- LM10 – projekcija prvog analnog nerva (1A) na obod krila
- LM11 – završetak trećeg kubitalnog nerva (3Cu)

3.2.3 Izračunavanje varijabli oblika i varijabli veličine

Na osnovu položaja tačaka, definiše se oblik i veličina svake celine u uzorku. Oblik se definiše kao informacija koja nakon rotacije, skaliranja i translacije ostaje nepromenljiva (Klingenberg i Monteiro, 2005), dok se veličina definiše preko veličine centroida. Centroid predstavlja centar konfiguracije odabranih specifičnih tačaka. Veličina centroida predstavlja kvadratni koren sume kvadratnih korena distanci svake specifične tačke od centroida (Zelditch i sar., 2012).

Kako bi se eliminisale razlike u položaju, orijentaciji i veličini primenjena je Generalizovana Prokrastova Analiza (*General Procrustes Analysis - GPA*) u okviru softvera MorphoJ (Dryden i Mardia, 1998). Prokrastovom superimpozicijom se dobijaju Prokrastove koordinate, koje definišu oblik analizirane strukture, dok se varijable veličine zadržavaju i predstavljene su kao veličine centroida i logaritmovane vrednosti veličine centroida (Dryden i Mardia, 1998). Kao mera oblika, umesto Prokrastovih koordinati, kod bilateralno simetričnih objekata definisane su simetrične i asimetrične komponente (Klingenberg i sar., 2002).

3.2.4 Statističke analize

Analiza varijanse (ANOVA) je primenjena da bi se utvrdilo da li postoje između analiziranih vrsta (kao varijabla veličine korišćen je CS). Za međusobno poređenje i utvrđivanje statistički značajnih razlika u srednjoj veličini krila i petiolusa između vrsta korišćen je Tuckey Post-hoc test. Za analizu varijabilnosti u obliku krila i petiolusa, primenjena je multivarijantna analiza varijanse (MANOVA) na koordinatama oblika (Prokrastove

koordinate u slučaju krila, odnosno simetrične komponente oblika kod petiolusa). Sve prethodno pomenute analize su urađene u softverskom paketu Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2004).

Kako bi procenili da li je u analiziranom uzorku alometrija statistički značajna, odnosno da li promene u veličini značajno utiče na promene oblika, primenjena je *pooled within speceis* multivarijantna regresija pri čemu su skalirane Prokrastove distance u slučaju krila, odnosno simetrične komponente oblika u slučaju petiolusa, na logaritmovanu vrednost veličine centroida (Monteiro, 1999). Uz pretpostavku da su alometrijske promene za sve analizirane vrste iste ili veoma slične, *pooled within speceis* regresijom se eliminišu alometrijske razlike unutar vrsta. Ovaj tip regresije se koristi za ontogenetsko skaliranje, ali i u taksonomskim studijama za korekciju veličine (Frost i sar., 2003; Sterlin i sar., 2016). U slučaju da je alometrija statistički značajna, za dalje analize je korišćena nealometrijska komponenta varijabilnosti, odnosno reziduali dobijeni multivarijantnom regresijom varijabli oblika na varijablu veličine.

3.2.5 Eksplorativne metode i metode vizuelizacije

Analizom glavnih komponenti (PCA) moguće je utvrditi glavne obrasce variranja oblika u uzorku i položaj jedinki u morfoprostoru. Kanonijska diskriminantna analiza (CVA) maksimalno uvećava razlike između unapred definisanih grupa, dok diskriminantna analiza u kojoj je integrisan validacioni test ukazuje da li je moguće grupe pouzdano identifikovati (Klingenberg i McIntyre, 1998; Klingenberg i sar., 2002). Diskriminantna analiza (DA) ispituje razlike između dve grupe koje su unapred definisane. Po tome što se porede samo dve grupe, DA se razlikuje od CVA (Timm, 2002). U slučaju malog uzorka sa velikim brojem specifičnih tačaka, DA analiza često preuveličava razlike između grupa. U tom slučaju, validacioni test (*leave-one-out cross validation test*) se koristi za procenu pouzdanosti diskriminantne analize (Dunne i Stone, 1993). Sve pomenute analize su integrisane u MorphoJ softverskom paketu.

Podaci PCA i CVA analiza su eksportovani iz MorphoJ softvera. U Rstudio softverskom paketu (RStudio Team, 2016), korišćenjem ggplot2 softverskog programa pravljani su 2D grafici (Wickham, 2016).

3.3 Molekularna analiza

3.3.1 Ekstrakcija, amplifikacija i sekvenciranje DNK

Utvrđivanje interspecijskih odnosa u okviru roda *Binodoxys* izvršeno je na osnovu analize sekvenci mitohondrijskog gena za citohrom oksidazu I (COI). Prema protokolu koji su dali Petrović i sar. (2018) izvršena je ekstrakcija, amplifikacija i sekvenciranje DNK.

Upotrebom Qiagen Dnase Blood & Tissue Kit-a ukupna DNK svake individue je izolovana. Pod binokularom je izvršeno punktiranje toraksa osice sterilnom iglom. Zatim su jedinke stavljane u tubice zapremine 1,5 ml, u koje je prethodno dodato 180 µl ekstrakcionog pufera (ATL pufer) i 20 µl enzima (proteinaza K). Inkubacija tubica trajala je 12 sati, na temperaturi od 56 °C u termo bloku. Tokom ovog perioda, meka tkiva se uklanjaju, a nukleinski sadržaj se rastvara u puferu. Nakon inkubacije, u 80 µl AE pufera je rastvorena izolovana DNK, a zatim čuvana na temperaturi od -20 °C. Osice iz kojih su izlovane DNK su prebacivane u novu tubice zapremine 1,5 ml ispunjene 96% etil-alkoholom i čuvane za dalje morfološke analize.

Za umnožavanje fragmenta citohrom oksidaze subjedinice I (COI) mitohondrijske DNK korišćena su dva prajmera, LCO1490 i HCO2198 (Folmer i sar., 1998), čime nastaju produkti veličine oko 670 baznih parova. Amplifikacija pomenutog regiona DNK je izvršena lančanom reakcijom polimeraze (PCR) u zapremini od 40 µl koja sadrži 2 µl izolovane DNK, 0,4 µl KAPA Taq polimeraze, 2 µl LCO1490 prajmera, 1 µl HCO2198 prajmera, 2,4 µl nukteotida, 3,6 MgCl₂, 4 µl pufera i 23,6 H₂O. Protokol za umnožavanje DNK, vršeno u Eppendorf Mastercycler® ep, je sledeći:

-inicijalna denaturacija je trajala 5 minuta na temperaturi od 96 °C i obuhvatala je 35 ciklusa u kojima je denaturacija trajala 60 sekundi,

-elongacija je trajala 1 minut na temepraturi od 54 °C,

-ekstenzija je trajala 90 sekundi na temperaturi od 72 °C, i na kraju

-finalna ekstnzija koja je izvođena na temperaturi 72 °C u trajanju od 5 minuta.

Provera uspešnosti umnožavanja COI gena , je testirana na 1% agaroznom gelu obojenim etidijum bromidom. Količina od 5 µl amplifikovane DNK je elektorforetski razdvajana na gelu i vizualizovana pod UV transiluminatorom.

Prečišćavanje i sekvenciranje umnožene DNK je uradila Macrogen kompanija (Seul, Južna Korea).

Ukupno je izolovano 3 sekvenci za vrste *B. angelicae*, *B. centaureae* i *B. similis*, dok su sekvence za preostale tri vrste (*B. aculephae*, *B. brevicornis* i *B. heraclei*), kao i za kontrolnu grupu (*outgroup*) *Ephedrus persicae* preuzete iz banke gena (National Center for Biotechnology Information). (Tabela 4).

Tabela 4. Spisak uzoraka korišćenih u analizama COI gena. Skraćenice: BEL – Belgija, MNE – Crna Gora, SRB – Srbija, SWE – Švedska. Pristupni broj je dat za sekvence koje su preuzete iz banke gena.

Lokalitet i datum	Biljka	Biljna vaš	Parazitoid	Pristupni broj
SRB, Beograd, 28.06.2014	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Aphis craccivora</i>	<i>B. aculephae</i>	MK080160
SWE, Uppsala, 02.07.2014.	<i>Malus</i> sp.	<i>Aphis pomi</i>	<i>B. angelicae</i>	
MNE, Durmitor, Sušica, 27.07.2015	<i>Sanicula europaea</i>	<i>Hyadaphis foeniculi</i>	<i>B. brevicornis</i>	MF287649
SRB, Zlatibor, 26.06.2013.	<i>Centaurea</i> sp.	<i>Uroleucon jaceae</i>	<i>B. centaureae</i>	
MNE, Put za Šavnik, 07.08.2013.	<i>Pastinaca</i> sp.	<i>Cavariella aegopodii</i>	<i>B. heraclei</i>	MF287648
BEL, Viridaxis, 02.09.2015.	<i>Epilobium hirsutum</i>	<i>Aphis</i> sp.	<i>B. similis</i>	
BEL, Louvain-la-Neuve 11.05.2015.	<i>Prunus avium</i>	<i>Myzus cerasi</i>	<i>Ephedrus persicae</i>	KY213710

3.3.2 Filogenetske analize

Dobijene sekvence su obrađene u softveru FinchTV (www.geospiza.com). Poravnavanje i međusobno poređenje sekvenci je urađeno u CLUSTAL W programu koji je integrisan u softverski paket MEGA 6 (Tamura i sar., 2011). Genetičke distance između analiziranih sekvenci su izračunate pomoću „Kimura’s two-parameter method“ (K2P) „bootstrap“ metode sa 1000 ponavljanja. Za rekonstrukciju filogenetskih odnosa korišćen je Maximum Likelihood (ML) metod sa 1000 „bootstrap“ replikacija. Kao najbolji model za rekonstrukciju filogenetskih odnosa izabran je Tamura and Nei 93 sa gama distribucijom (TN93+G) (Nei i Kumar, 2000). Sve pomenute analize su rađene u MEGA 6 softverskom paketu.

3.4 Evolucione promene u obliku i veličini petiolusa i krila

Rezultati filogenije mapirani su na oblik analiziranih struktura (Maddison, 1991). Testiranjem prisustva filogenetskog signala i konstruisanjem filo-morofprostora, odnosno prikazivanjem filogenije u morfološkom prostoru, može se zaključiti u kojoj meri se javljaju sličnosti u obliku morfoloških struktura između različitih taksona (homoplazija). U kombinaciji sa PCA analizom, ovom metodom je moguće utvrditi evoluciju oblika u analiziranom uzorku (Klingenberg and Gidaszewski 2010).

3.5 Skening elektronska mikroskopija (*Scanning electron microscopy* - SEM)

Dve metode mikroskopije su korišćene za morfološke analize. Šest ženki evropskih vrsta roda *Binodoxys* je disekovano, presvučeno je zlatnim prahom i slikano na skening elektronskom mikroskopu JEOL JSM-5300LV. Analizirane su sledeće morfološke strukture: glava, antene, prva dva flagelarna segmenta antena, propodeum, petiolus, legalica i nastavci osmog metazomalnog segmenta ženki. Iste strukture analizirane su i na Leica mikroskopu DM2500, svetlosnom mikroskopu.

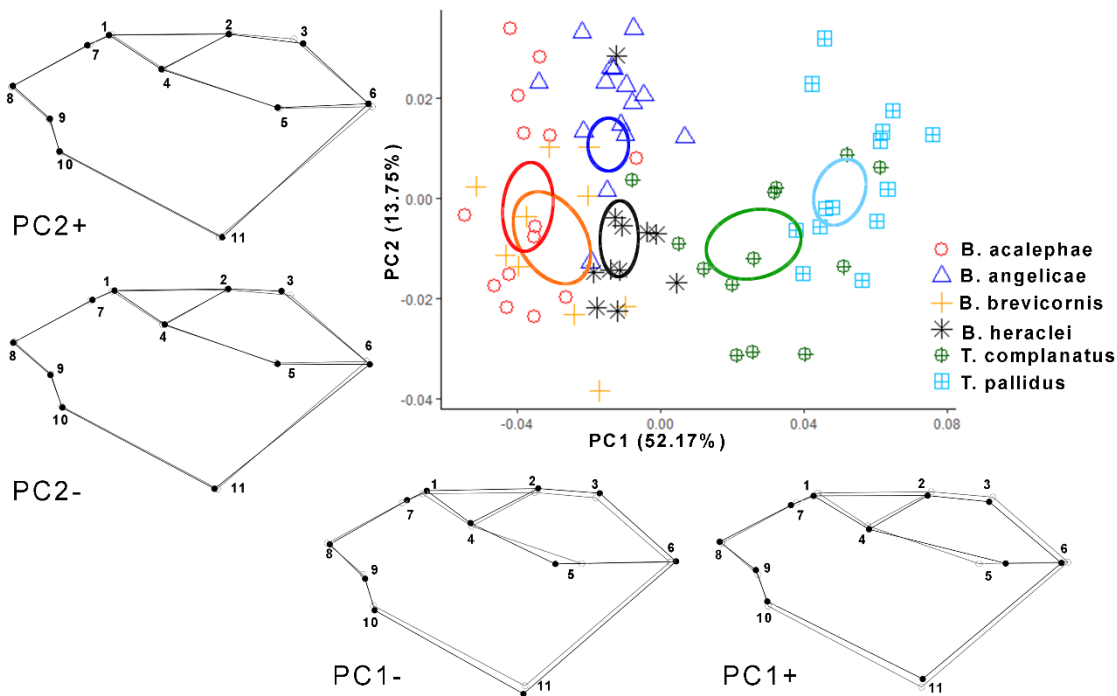
4 Rezultati

4.1 Geometrijska morfometrija

4.1.1 Razdvajanje vrsta rodova *Binodoxy* i *Trioxys*

U analizu je uključeno dve vrste roda *Trioxys* i četiri vrste roda *Binodoxys*. Ukupno je analizirano 78 prednjih krila.

Analizom glavnih komponenti vrste roda *Trioxys* su razdvojene duž prve PC ose, koja objašnjava 52,7% ukupne varijabilnosti u obliku krila (Slika 20). Krila vrsta *T. complanatus* i *T. pallidus* su uža i sa dužim r&RS nervom (za nomenklaturu pogledati sliku 19 i Tabelu 3). Sa druge strane, analizirane četiri vrste roda *Binodoxys* imaju šira krila sa kraćim pomenutim nervom. Duž druge ose glavnih komponenti (PC2 = 13,75%) u okviru rodova dolazi do razdvajanja vrsta na osnovu dužine R1 nerva. Kod vrste *B. angeliae* pomenuti nerv je najduži u poređenju sa preostalim *Binodoxys* vrstama. Između analizirani vrsta roda *Trioxys* razlika u dužini R1 nerva nije toliko primetna, ali je uočeno da *T. pallidus* ima duži nerv (Slika 20).

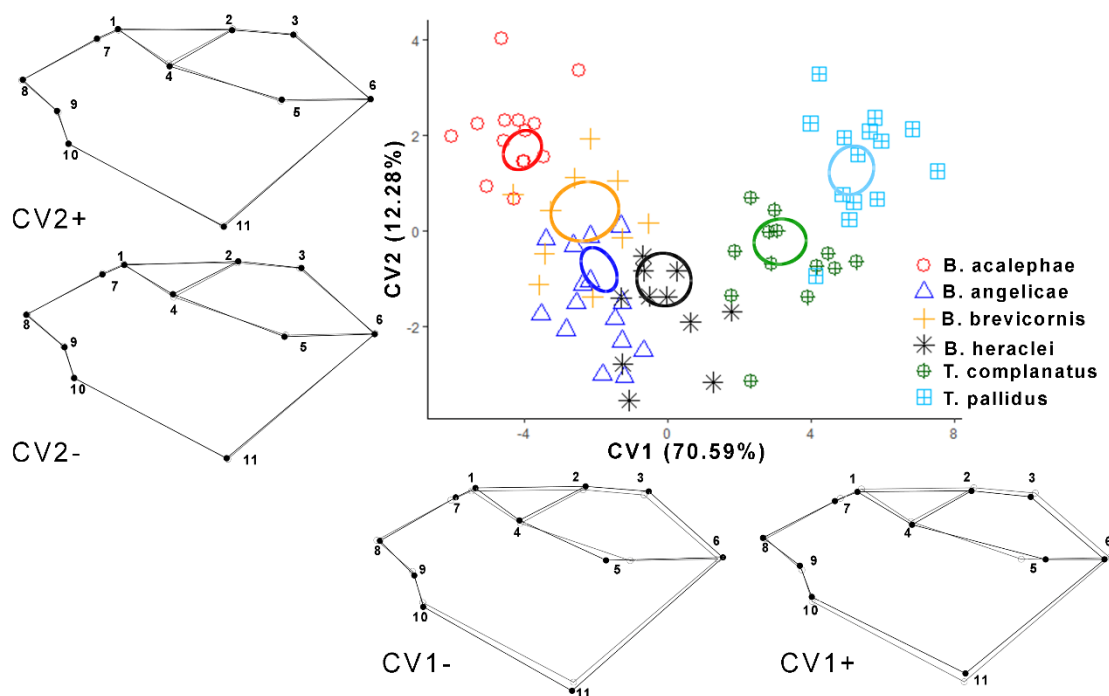


Slika 20. Položaj *Binodoxys* i *Trioxys* vrsta u morfoprostoru definisanim prvim dvema PC osama. Elipse predstavljaju 90% intervala pouzdanosti za srednje vrednosti oblika krila vrsta.

Promene u obliku krila prikazane su *wireframe* graficima; crnom bojom označene su jedinice sa najvećim pozitivnim i negativnim vrednostima duž PC osa, dok su sivom bojom označene srednje vrednosti oblika petiolusa za čitav uzorak.

Analiza varijanse pokazala je da postoje statistički značajne razlike u veličini (ANOVA na CS, $F_{5,71} = 3,06$; $P = 0,014$) krila. Takođe, multivarijantna analiza varijanse (MANOVA na Prokrastesove distance, Willks' $\lambda = 0,002824$; $F_{90,266} = 7$; $P < 0,001$) je ukazala na statistički značajne razlike u obliku krila.

Kanonijskom diskriminantnom analizom su potvrđeni rezultati dobijen PCA analizom. Duž prve CV1 ose (70,59%) se razdvajaju rodovi, dok se duž druge kanonijske ose (CV2 = 12,22%) razdvajaju vrste unutar roda *Binodoxys*. Rodovi se razlikuju na po dužini i širini krila, kao i na osnovu dužine r&RS nerva. Dve analizirane *Trioxys* vrste imaju kraća i uža krila sa dužim pomenutim nervom. *B. acalephae* se duž druge kanonijske ose razdvaja od *B. heraclei* i *B. angelicae* na osnovu širine stigme. Stigma je najšira kod vrste *B. acalephae*, dok je najuža kod vrste *B. angelicae* (Slika 21)



Slika 21. Položaj *Binodoxys* i *Trioxys* vrsta u morfoprostoru definisanim prvim dvema CV osama. Elipse predstavljaju 90% intervala pouzdanosti za srednje vrednosti oblika krila vrsta.

Promene u obliku krila prikazane su *wireframe* graficima; crnom bojom označene su jedinice sa najvećim pozitivnim i negativnim vrednostima duž CV osa, dok su sivom bojom označene srednje vrednosti oblika petiolusa za čitav uzorak.

4.1.2 Razdvajanje vrsta roda *Binodoxys*

4.1.2.1 Geometrijska morfometrija petiolusa

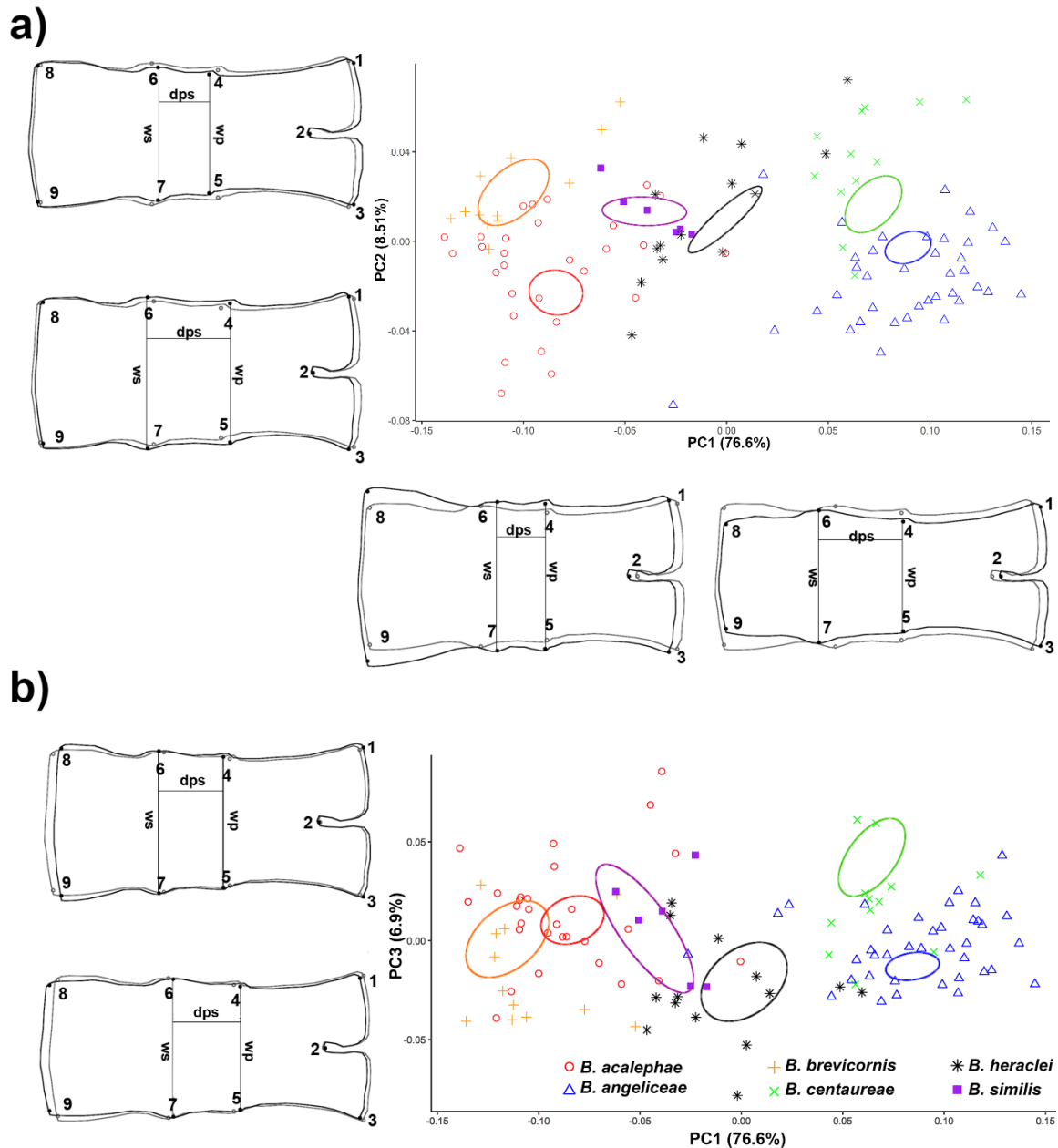
Analiza glavnih komponenti (PCA) je ukazala na postojanje 7 PC osa, pri čemu prva osa opisuje najveću varijabilnost dok poslednje ose gotovo i da ne objašnjavaju varijabilnost (Tabela 5).

Tabela 5. Prikaz rezultata PCA analize dobijene na osnovu položaja 9 simetričnih specifičnih tačaka koje opisuju oblik i veličinu petiolusa.

PC osa	Sopstveni vektori (<i>eignevalues</i>)	% varijanse	Kumulativni %
1	0.00881227	76.6	76.6
2	0.00097983	8.517	85.117
3	0.00079452	6.906	92.024
4	0.00036056	3.134	95.158
5	0.00024167	2.101	97.258
6	0.00021499	1.869	99.127
7	0.0001004	0.873	100

PCA pokazala je jasno razdvajanje vrsta na dve morfo-grupe: „*angelicae*“ i „*acalephae*“. U „*angelicae*“ grupi se nalaze *B. angelicae* i *B. centaureae*, koje su pozicionirane u pozitivnom delu PC1 ose (PC1 = 76,6%), dok se *B. acalephae*, *B. brevicornis*, *B. heraclei* i *B. similis*, koje pripadaju „*acalephae*“ grupi, nalaze u negativnom delu PC1 ose. Razlike između pomenute dve grupe se ogledaju u obliku petiolusa i rastojanju između primarnih i sekundarnih tuberkula. Naime, u „*angelicae*“ grupi petiolusi su uski i izduženi. Takođe, rastojanje između primarnih i sekundarnih tuberkula (dps) je veći u poređenju sa razmakom između primarnih tuberkula (wp). Posteriorni deo petiolusa (LM 8 i 9), koji se spaja za drugi metazomalni segment je veoma uzak. Sa druge strane, „*acalephae*“ grupa se odlikuje kratkim, širokim petiolusima sa širokim posteriornim delom. Razmak između primarnih tuberkula (wp) je skoro jednak razmaku

između sekundarnih tuberkula (ws), ali je razmak između primarnih i sekundarnih tuberkula (dps) manji u odnosu na distancu u nivou primarnih tuberkula (wp) (Slika 22). Po drugoj PC osi (8,51%), mogu se razdvojiti vrste unutar „*angelicae*“ grupe, po širini petiolusa u nivou primarnih tuberkula (wp); kod vrste *B. centaureae* petiolus je u nivou primarnih tuberkula uži u odnosu na širinu u nivou sekundarnih tuberkula, dok je petiolus kod *B. angelicae* skoro jednake širine u nivou primarnih i sekundarnih tuberkula. Vrsta *B. acalephae* se izdvaja po drugoj PC osi od ostalih pripadnika „*acalephae*“ grupe po tome što je intertuberkularna distanca (dps) veća nego kod ostalih pripadnika „*acalephae*“ morfo-grupe. Po trećoj osi, koja nosi 6,9% ukupne varijabilnosti odvajaju se *B. brevicornis* i *B. heraclei*, koji imaju uži posteriorni deo petiolusa, ali i manju intertuberkularnu distancu u poređenju sa *B. acalephae*, dok *B. similis* pokazuje veliku varijabilnost (Slika 22b).



Slika 22. Položaj *Binodoxys* vrsta na osnovu morfologije petiolusa u morfološkom prostoru definisanim: a) PC1 i PC2 osama; b) PC1 i PC3 osama. Elipse predstavljaju 90% intervala pouzdanosti za srednje vrednosti oblika petiolusa vrsta. Promene u obliku petiolusa prikazane su *outline* graficima; crnom bojom označene su jedinice sa najvećim pozitivnim i negativnim vrednostima duž PC osa), dok su sivom bojom označene srednje vrednosti oblika petiolusa za čitav uzorak.

Analiza varijanse pokazala je da postoje statistički značajne razlike u veličini (ANOVA na CS, $F_{5,11} = 32,225$; $P < 0,001$) petiolusa. Rezultati Tuckey Post-hoc testa su statistički značajni za sve parove osim za pet parova (Tabela 6).

Tabela 6. Rezultati Tukey Post-hoc testa. Iznad dijagonale prikazani su rezultati dobijeni na osnovu morfologije petiolusa, dok su ispod dijagonale rezultati za krila. Zvezdicom su označene statistički značajne vrednosti, odnosno vrednosti za koje je $P < 0,05$.

Petiolus							
Kрила	Grupa	<i>B. acalephae</i>	<i>B. angelicae</i>	<i>B. brevicornis</i>	<i>B. centaureae</i>	<i>B. heraclei</i>	<i>B. similis</i>
	<i>B. acalephae</i>		0,000120*	0,183076	0,000120*	0,046621*	0,000662*
	<i>B. angelicae</i>	0,003993*		0,000120*	0,915318	0,000120*	0,398971
	<i>B. brevicornis</i>	0,747552	0,599355		0,000120*	0,912599	0,000122*
	<i>B. centaureae</i>	0,000028*	0,211065	0,012299*		0,000120*	0,177274
	<i>B. heraclei</i>	0,414743	0,996747	0,979606	0,275466		0,000122*
	<i>B. similis</i>	0,148568	0,000230*	0,0241308*	0,000021*	0,010177*	

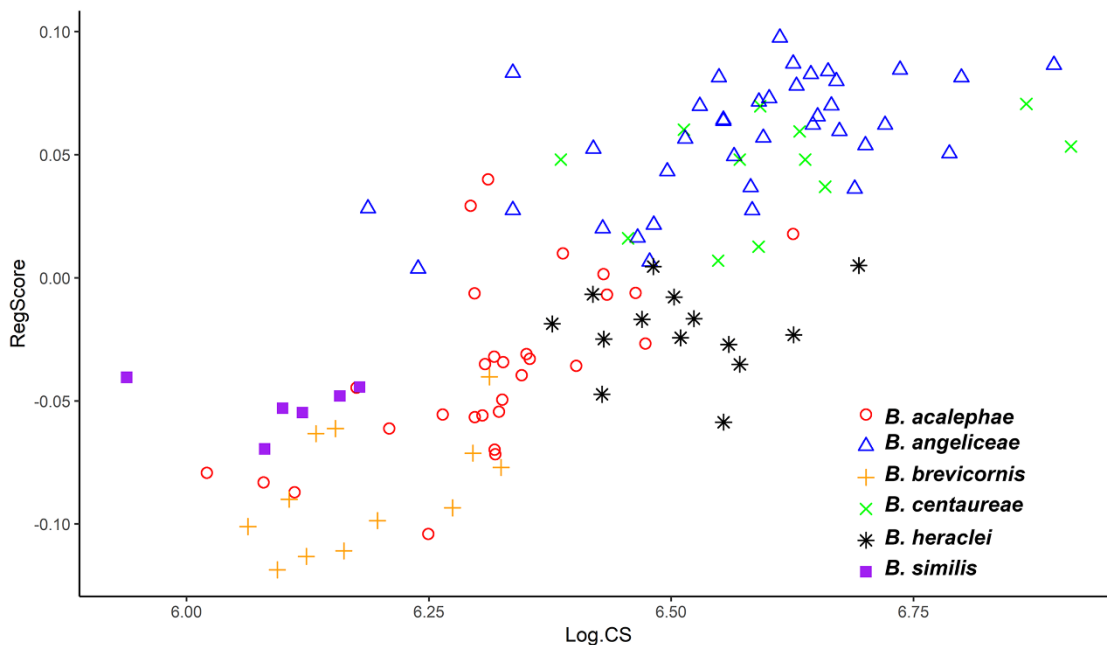
Na osnovu veličine centroida utvrđeno je da najveće petioluse poseduju vrste „*angelicae*“ morfo-grupe (Tabela 7); jedinke vrste *B. centaureae* imaju najveće petioluse, a zatim *B. angelicae*. Unutar „*acalephae*“ morfo-grupe, najkrupnije petioluse ima *B. heraclei*, koji se nalazi između „*angelicae*“ morfo-grupe i ostalih predstavnika „*acalephae*“ grupe. Veoma sitni petiolusi su prisutni kod vrsta *B. similis* i *B. brevicornis*, dok je *B. acalephae* između njih i *B. heraclei* (Tabela 7).

Tabela 7. Prikaz razlika između šest analiziranih vrsta u veličini petiolusa i krila.

Vrsta	Petiolus		Kрила	
	Srednja vrednost veličine centroida (CS)	Standardna devijacija (SD)	Srednja vrednost veličine centroida (CS)	Standardna devijacija (SD)
<i>B. acalephae</i>	556,35	67	749,64	44,22
<i>B. angelicae</i>	725,09	102,82	774,22	30,34
<i>B. brevicornis</i>	488,08	45,6	760,95	33,47
<i>B. centaureae</i>	753,23	119,79	794,6	36,38
<i>B. heraclei</i>	674,46	59,39	769,18	27,14
<i>B. similis</i>	445,23	36,39	718,54	19,9

Razlike u obliku petiolusa su statistički značajne (MANOVA za simetrične komponente oblika, Willks'λ = 0,015753; $F_{35,4} = 20,1$; $P < 0,001$). Prokrastesove distance su statistički značajne ($P < 0,0001$), a statistička značajnost se dobija permutacionim testovima na osnovu 10,000 permutacija. Nakon Bonferroni korekcije, koja je uređena zbog multipnih poređenja, razlike u obliku između *B. centaureae* – *B. similis* i *B. heraclei* – *B. similis* nisu bile statistički značajne.

Uticaj veličine na oblik petiolusa analiziran je *pooled within species* regresijom na logaritmovane vrednosti CS, pri čemu procenat promena u obliku izazvanih razlikama u veličini iznosi 6% i statistički je značajan ($P < 0,001$) (Slika 23).



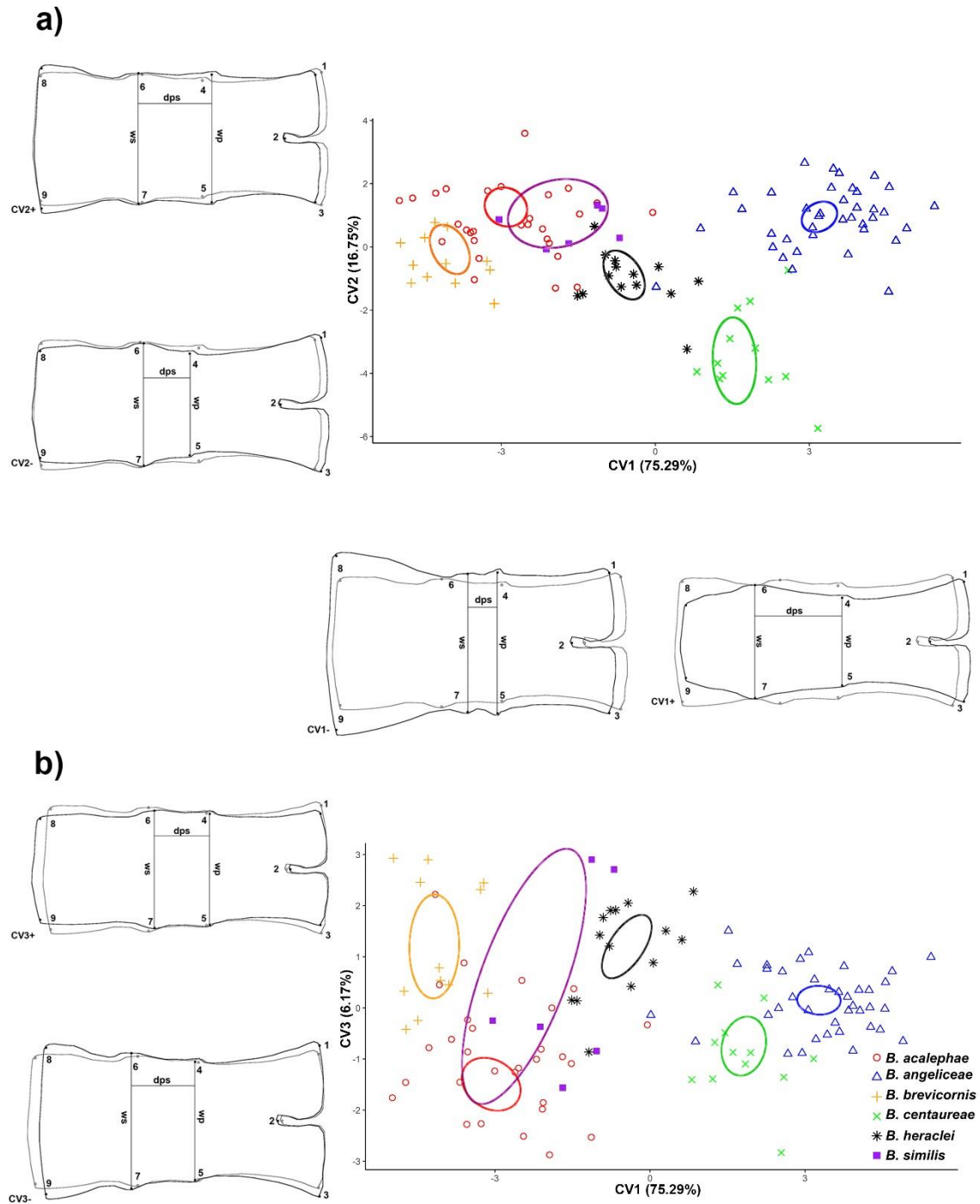
Slika 23. *Pooled within species* regresija na logaritmovane vrednosti veličine centroida (CS).

Da bi se eliminisale promene u obliku uslovljene veličinom petiolusa, u daljim analizama korišćena je nealometrijska komponenta morfološke varijabilnosti, odnosno reziduali iz prethodne regresije. Kako bi se utvrdilo koje osobine najviše doprinose razlikama između grupa, kanonijska diskriminativna analiza je primenjena na rezidualima regresije. Procenat ukupne varijabilnosti koji objašnjavaju CV ose se neznatno povećao u poređenju sa procentima dobijenim PCA analizom (Tabela 8).

Tabela 8. Prikaz rezultata CVA analize dobijene na osnovu položaja 9 simetričnih specifičnih tačaka koje opisuju oblik i veličinu petiolusa.

CV osa	Sopstveni vektori (<i>eigenvalues</i>)	% varijanse	Kumulativni %
1	8.69795026	75.292	75.292
2	1.93577231	16.757	92.049
3	0.71317088	6.173	98.222
4	0.13586587	1.176	99.398
5	0.06954076	0.602	100

Na osnovu prve dve CV ose jasno se odvajaju predstavnici „*angelicae*“ morfo-grupe u pozitivnom delu CV1 ose (75,29% razlika). Naime, petiolusi ove dve vrste imaju jasno odvojene primarne i sekundarne tuberkule, čija distanca (dps) je veća od širine petiolusa u nivou primarnih tuberkula (wp) i petiolus je posteriorno uzak. Duž druge kanonijske ose (CV2 = 16,75%), *B. centaureae* se može razlikovati od *B. angelicae* po širem petiolusu u nivou sekundarnih tuberkula (ws) nego u nivou primarnih tuberkula (wp). Sa druge strane, pripadnici „*acalephae*“ morfo-grupe se nalaze u negativnom delu CV1 ose, odlikujući se širim petiolusima sa širim posteriornim delom i kraćom intertuberkularnom distancom. *Binodoxys brevicornis* poseduje petioluse kod kojih je intertuberkularna distanca (dps) najkraća (CV1 osa), sa približno istom širinom u nivou primarnih i sekundarnih tuberkula i užim posteriornim delom (CV3 = 6,17%). Duž CV1 ose, kod vrste *B. heraclei* petiolusi su najširi u nivou primarnih tuberkula (CV1) i sa užim posteriornim delom (CV3). Sa druge strane, petiolusi vrste *B. acalephae* su najširi u nivou sekundarnih tuberkula i imaju veoma širok posteriorni deo (CV3). *Binodoxys similis* pokazuje veliku unutar grupnu varijabilnost duž treće kanonijske ose (CV3) (Slika 24).



Slika 24. Distribucija *Binodoxys* vrsta na osnovu morfologije petiolusa u morfoпростору definisanim: a) CV1 i CV2 osama; b) CV1 i CV3 osama. Elipse predstavljaju 90% intervala pouzdanosti za srednje vrednosti vrsta. Promene u obliku petiolusa prikazane su *outline* graficima; crnom bojom označene su promene (jedinke sa najvećim vrednostima duž CV osa), dok su sivom bojom označene srednje vrednosti oblika petiolusa.

4.1.2.2 Geometrijska morfometrija krila

Analiza glavnih komponenti (PCA) je ukazala na postojanje 18 PC osa, pri čemu prva osa opisuje najveću varijabilnost, dok poslednje ose gotovo i da ne objašnjavaju varijabilnost (Tabela 9).

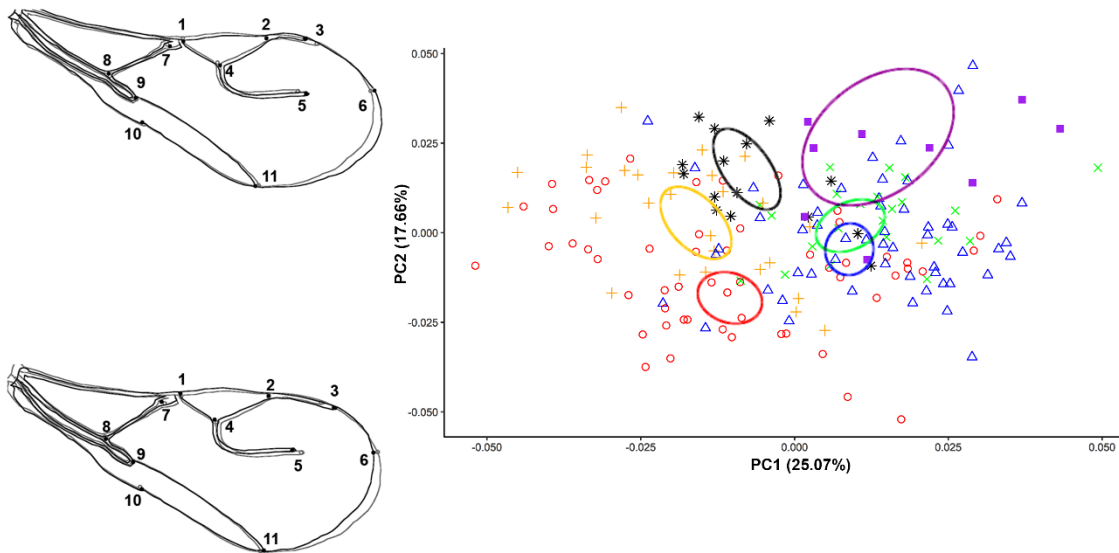
Tabela 9. Prikaz rezultata PCA analize dobijene na osnovu položaja 11 specifičnih tačaka koje opisuju oblik i veličinu krila.

PC osa	Sopstveni vektori (<i>eigenvalues</i>)	% varijabilnosti	Kumulativni %
1	0.00042246	25.079	25.079
2	0.00029754	17.663	42.741
3	0.00021951	13.031	55.772
4	0.00018408	10.927	66.699
5	0.0001179	6.999	73.698
6	0.00011333	6.727	80.426
7	0.00006171	3.663	84.089
8	0.00005334	3.167	87.256
9	0.00004827	2.865	90.121
10	0.00003541	2.102	92.224
11	0.00002946	1.749	93.973
12	0.00002247	1.334	95.306
13	0.00002173	1.29	96.597
14	0.00001447	0.859	97.455
15	0.00001356	0.805	98.26
16	0.00001084	0.644	98.904
17	0.00000936	0.556	99.46
18	0.0000091	0.54	100

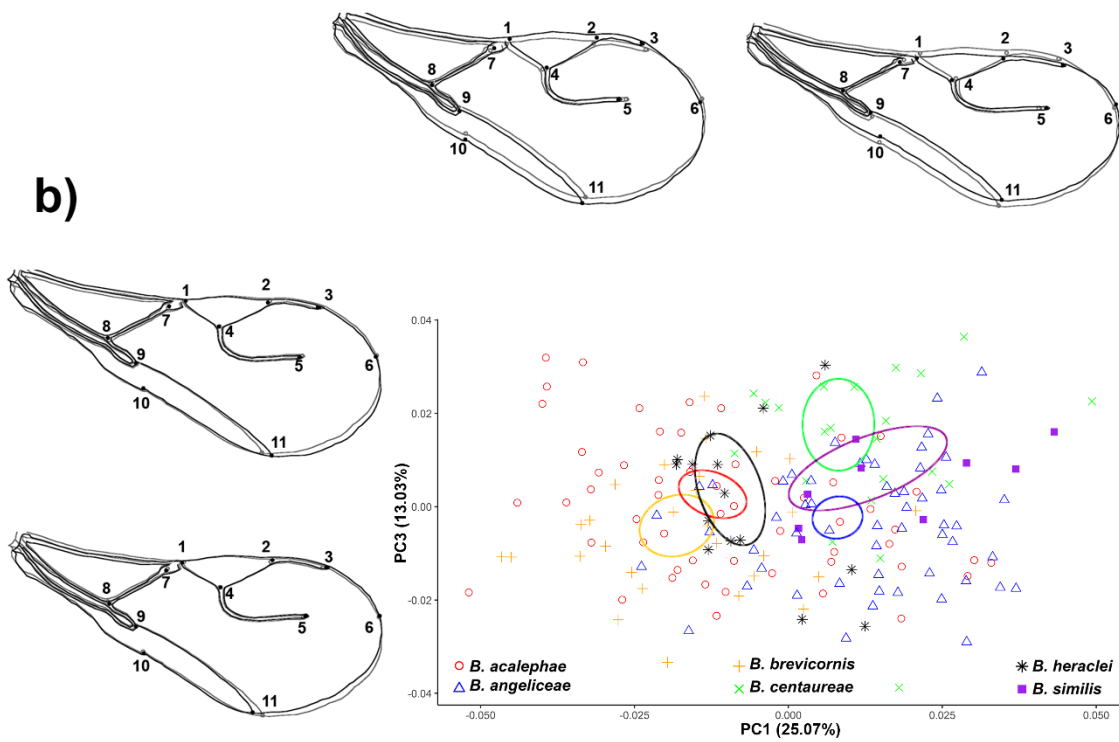
Analiza glavnih komponenti (PCA) prednjih krila odvaja dve morfološke grupe. U pozitivnom delu PC1 ose, koja objašnjava 25,07% ukupne varijabilnosti, nalaze se *B. angelicae*, *B. centaureae* i *B. similis*, vrste kod kojih su krila i stigma uže, sa dužim radijalnim (LM2 i 3) i r&RS nervima (LM4 i 5). Unutar ove grupe, duž PC2 ose (17,66%) odvaja se *B. similis* sa izduženim krilima (LM6), dok se preostale dve vrste razdvajaju duž treće PC ose (13,03%), na osnovu distalnog dela krila; kod *B. angelicae* je krilo uže, dok je kod *B. centaureae* ovaj deo krila izdužen. Vrste koje se nalaze u negativnom delu PC1 ose, *B. acalephae*, *B. brevicornis* i *B. heraclei*, poseduju široka krila, sa širokom stigmom, kraćim

radijalnim i r&RS nervima. U okviru ove grupe, *B. acalephae* ima najkraća krila, dok su kod *B. heraclei* krila najduža (Slika 25).

a)



b)

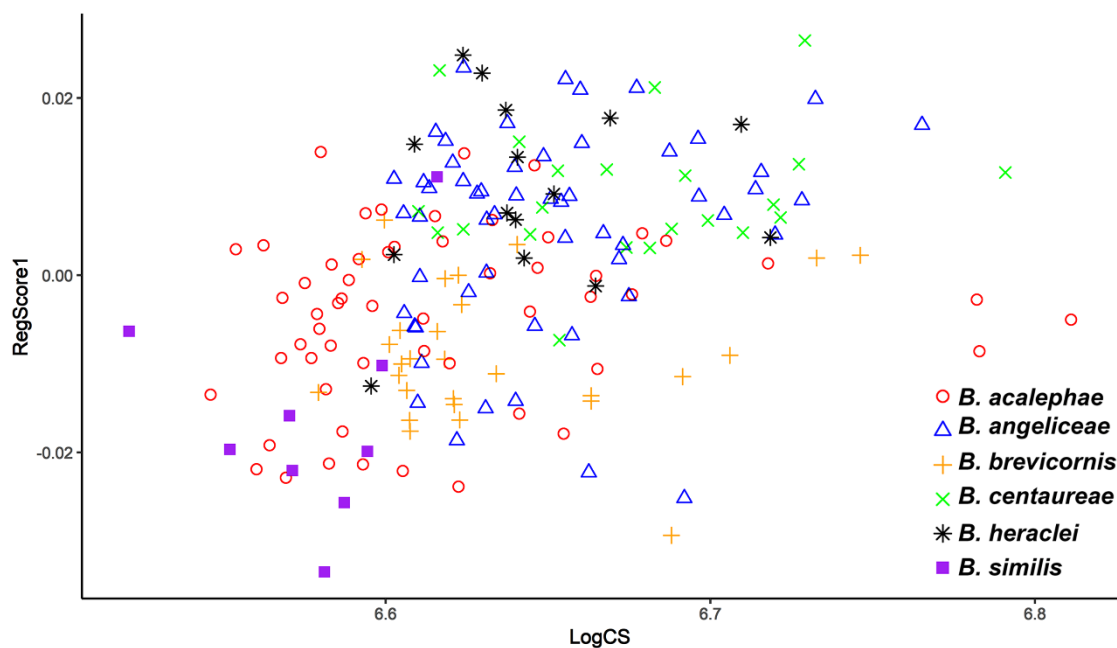


Slika 25. Distribucija vrsta na osnovu morfologije krila u morfoprostoru definisanim PC osama: a) morfoprostor definisan prvim dvema osama; b) morfoprostor definisan prvom i trećom osom. Elipse predstavljaju 90% intervala pouzdanosti za srednje vrednosti vrsta. Promene u obliku krila prikazane su *outline* graficima; crnom bojom označene su promene (jedinke sa najvećim vrednostima skorova na PC osama), dok su sivom bojom označene srednje vrednosti oblika krila.

Postojanje statistički značajnih razlika u veličini krila testirano je analizom varijanse (ANOVA na CS, $F_{(5, 179)} = 8,94$; $P < 0,001$). Rezultati Tuckey Post-hoc testa su statistički značajni za nešto manje od polovine parova (Tabela 6). Na osnovu srednje vrednosti veličine centroida najveća krila su kod vrste *B. centaureae*, a zatim *B. angelicae* i *B. heraclei*. Kod preostale tri vrste, krila *B. acalephae* i *B. brevicornis* su slične veličine, dok je *B. similis* sa najmanjim krilima (Tabela 7).

Utvrđeno je i postojanje statistički značajne razlike u obliku krila (MANOVA na Prokrastovim koordinatama, Willks' $\lambda = 0,025656$; $F_{(90, 790)} = 10$; $P < 0,001$). Razlike u obliku krila izračunate su kao Prokrastove distance. Permutacioni testovi pokazali su da se sve vrste statistički značajno razlikuju u obliku krila ($P < 0,0001$) osim *B. acalephae* – *B. brevicornis* za koji, nakon korekcije za multipna poređenja, nije utvrđena statistička značajnost..

Uticaj veličine na oblik krila analiziran je *pooled within species* regresijom na log CS, pri čemu procenat promena u obliku izazvanih razlikama u veličini iznosi 0,9% i statistički nije značajan ($P = 0,1084$) (Slika 26).



Slika 26. Pooled within species regresija na logaritmovane vrednosti veličine centorida (CS).

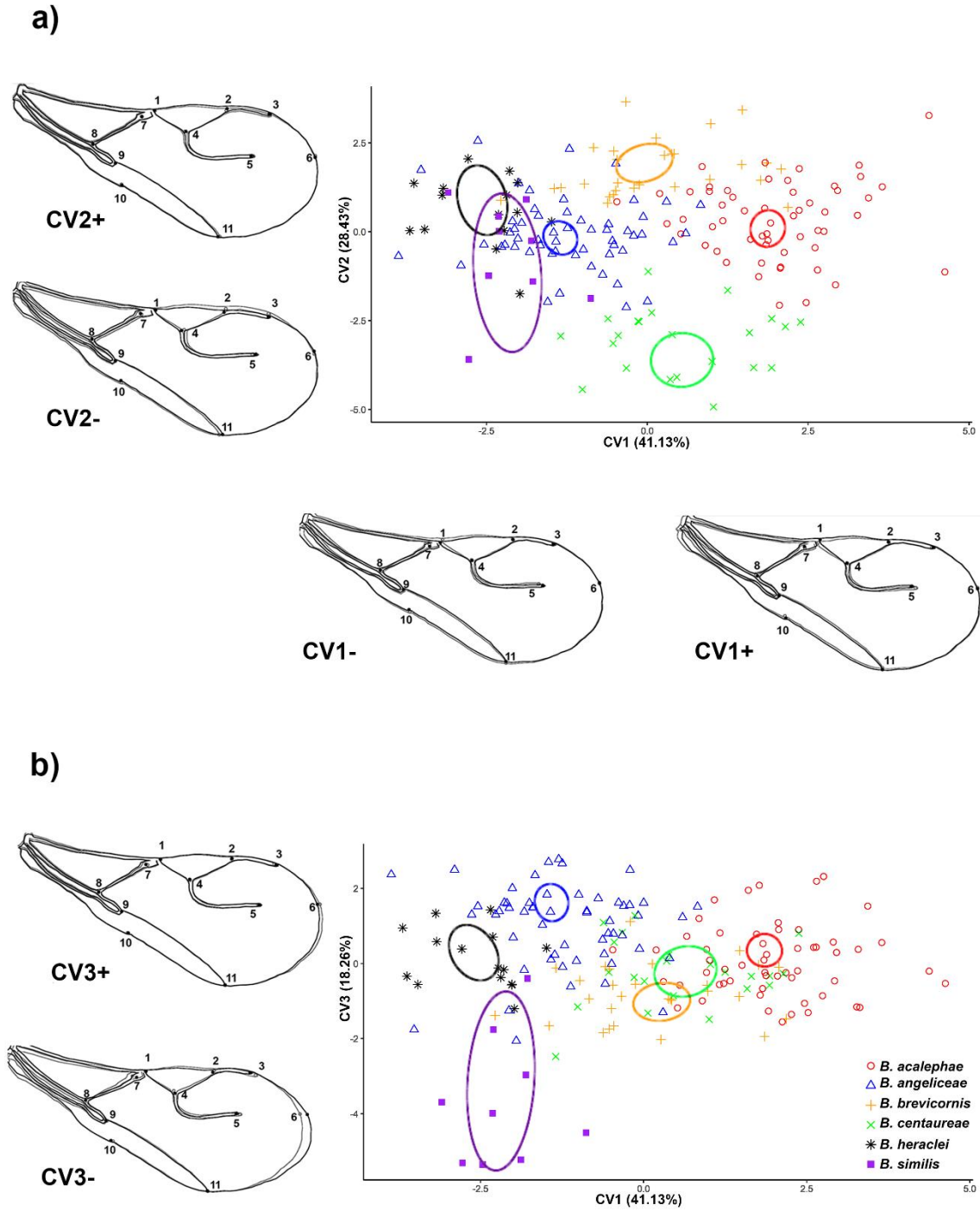
Pošto regresija nije pokazala statističku značajnost, kanonijska diskriminantna analiza je urađena na Prokrastovim koordinatama. Kako je analizirano šest vrsta, ukupna dimenzionalnost CVA analize se je iznosila 5 osa. Prva osa objašnjava najveći procenat varijabilnosti između analiziranih vrsta, dok poslednja osa (CV5) objašnjava oko 3% ukupne varijabilnosti (Tabela 10).

Tabela 10. Rezultati CVA analize na osnovu 11 LM definisanih na krilnoj ploči

CV osa	Sopstveni vektori (<i>eigenvalues</i>)	% varijabilnosti	Kumulativni %
1	2.49943256	41.13	41.13
2	1.72819237	28.438	69.568
3	1.11018532	18.269	87.837
4	0.5513826	9.073	96.91
5	0.18777711	3.09	100

Prve dve kanonijske ose opisuju 69,56% ukupnih razlika između analiziranih taksona. Tri vrste se jasno izdvajaju: *B. acalephae*, *B. brevicornis* i *B. centaureae*. *Binodoxys acalephae*,

se izdvaja u pozitivnom delu CV1 po tome što prednja krila imaju užu stigmom (LM 1, 2 i 4) i kraći r&RS nerv (LM 4 i 5), dok se u negativnom delu ove ose nalaze tri vrste: *B. angelicae*, *B. heraclei* i *B. similis*. Pomenute tri vrste imaju krila sa dužom stigmom i dužim RS nervom a razdvajaju se duž CV3 ose (18,26%) po dužini krila. Relativno izduženiji distalni deo krila ima *B. similis* i nalazi se u negativnom delu ose; centralno je pozicionirana vrsta *B. heraclei*, dok najkraća krila ima *B. angelicae*. Duž CV2 (28,43%) odvajaju se *B. brevicornis* u pozitivnom delu sa nešto širim krilima, odnosno *B. centaureae* u negativnom delu ose sa užim krilima (LM 2, 3, 10 i 11) (Slika 27).



Slika 27. Distribucija *Binodoxys* vrsta na osnovu morfologije krila u morfoпростору definisanim: a) CV1 i CV2 osama; b) CV1 i CV3 osama. Elipse predstavljaju 90% interval pouzdanosti za srednje vrednosti vrsta. Promene u obliku krila prikazane su *outline* graphicima; crnom bojom označene su promene (jedinke sa najvećim vrednostima duž CV osa), dok su sivom bojom označene srednje vrednosti oblika krila.

4.1.3 Diskriminantna analiza

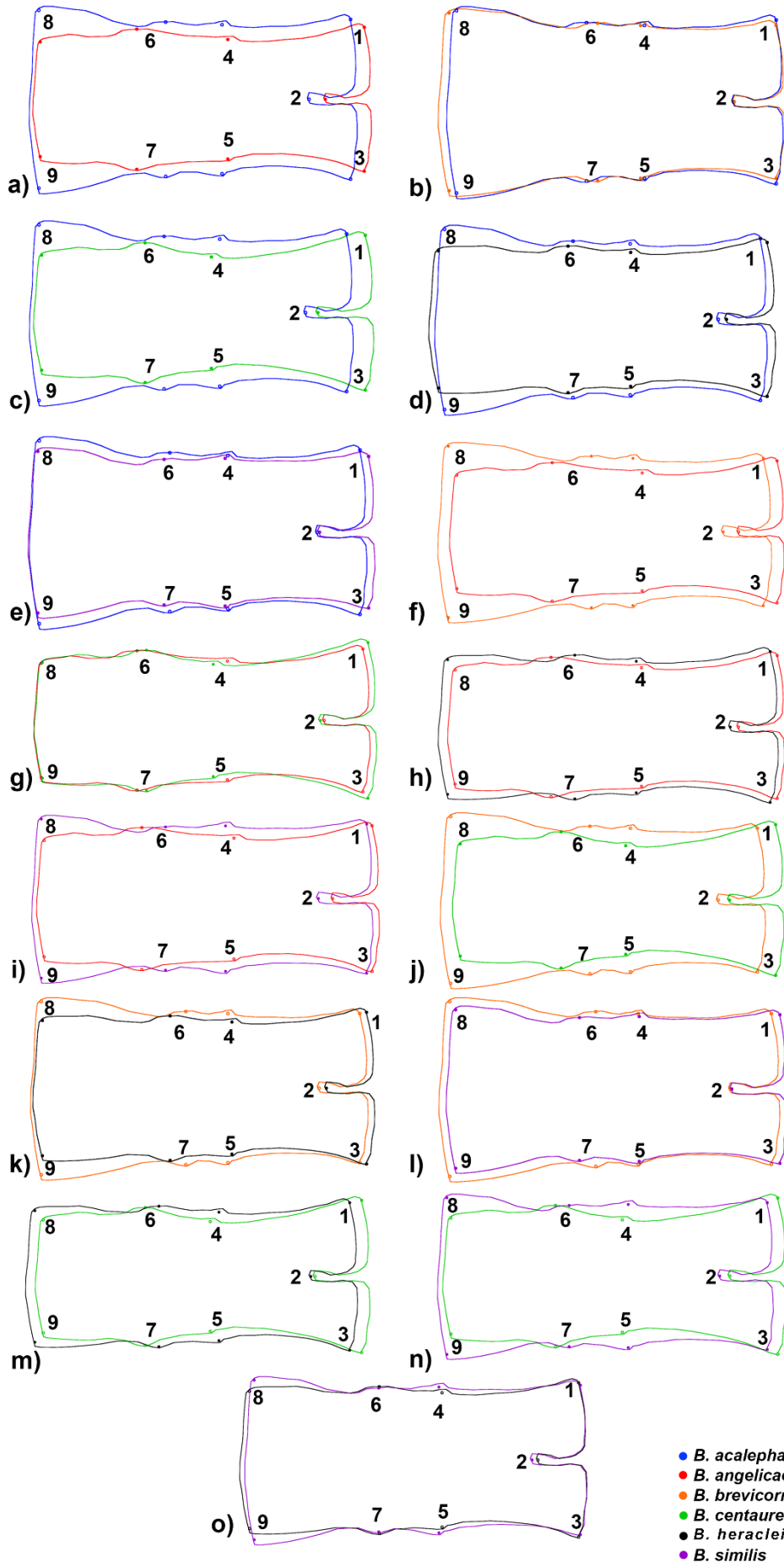
Razdvajanje evropskih vrsta roda *Binodoxys* na osnovu morfologije petiolusa potvrdili su i rezultati diskriminantne analize (Sika 28; Tabela 11). Promene su najuočljivije kod vrsta „*angelicae*“ morfo-grupe, koji poseduju petioluse sa jasno vidljivim primarnim i sekundarnim tuberkulama, ali i užim posteriornim delom petiolusa u odnosu na petioluse „*acalephae*“ morfo-grupe (Slika 28), što je potvrđeno procentima ispravne klasifikacije (veći od 97%) i rezultatima *cross validation* testa, gde su za obe vrste, *B. angelicae* i *B. centaureae* procenti veći od 88%. Širina u nivou primarnih tuberkula razdvaja vrste „*angelicae*“ morfo-grupe; petiolusi vrste *B. centaureae* su uži u nivou primarnih tuberkula u poređenju sa *B. angelicae* vrstom.

Tabela 11. Rezultati diskriminantne analize i validacionog testa eng. *cross validation test* (brojevi u zagradi) prikazani u procentima tačne klasifikacije za svaki par vrsta. Iznad dijagonale su rezultati za petioluse, dok su ispod dijagonale prikazani rezultati analiza na osnovu oblika prednjih krila.

Petiolus							
Krila	Grupa	<i>B. acalephae</i>	<i>B. angelicae</i>	<i>B. brevicornis</i>	<i>B. centaureae</i>	<i>B. heraclei</i>	<i>B. similis</i>
	<i>B. acalephae</i>		100 (95.52)	92.68 (85.36)	100 (100)	93.02 (86.04)	97.42 (82.85)
	<i>B. angelicae</i>	95.49 (90.99)		100 (98)	96 (96)	98.14 (94.23)	97.42 (90.90)
	<i>B. brevicornis</i>	95.23 (83.33)	93.97 (85.54)		100 (100)	100 (100)	100 (88.88)
	<i>B. centaureae</i>	98.71 (92.31)	98.7 (92.2)	100 (96)		100 (96.15)	100 (100)
	<i>B. heraclei</i>	100 (98.59)	97.14 (91.42)	97.67 (90.69)	100 (91.89)		95 (76.19)
	<i>B. similis</i>	100 (96.92)	98.43 (92.18)	100 (86.48)	100 (90.32)	100 (79.16)	

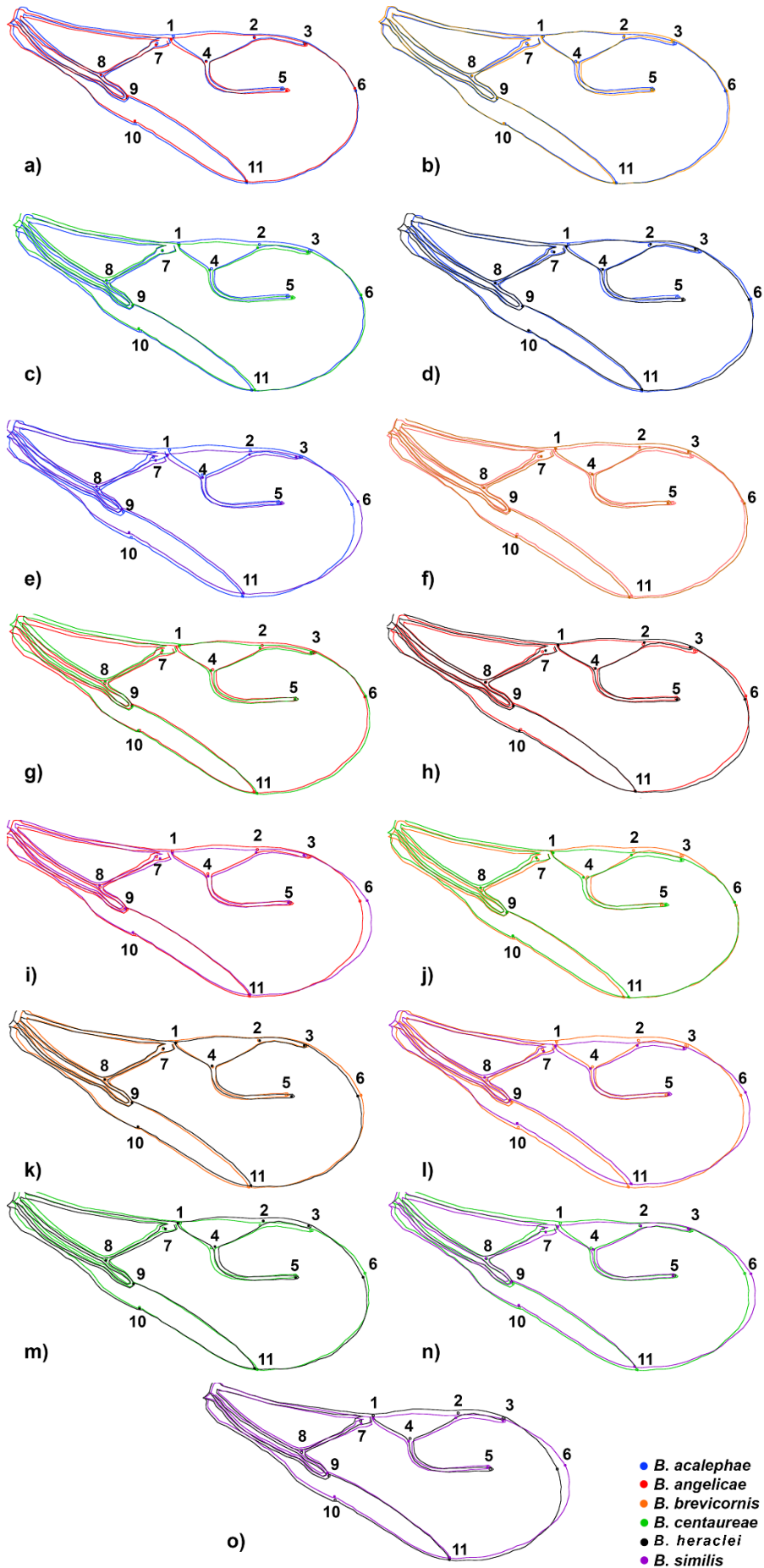
Rezultati korektne klasifikacije (92,68%) i validacionog testa (85,36%) ukazuju da je petiolus vrste *B. brevicornis* morfološki najsličniji petiolusu vrste *B. acalephae* (Tabela 11), ali se vrsta *B. brevicornis* može razlikovati po veoma blisko postavljenim primarnim i

sekundarnim tuberkulama, po čemu se može odvojiti i od preostale dve vrste „*acalephae*“ morfo-grupe (Slika 28). *Binodoxys acalephae* se od preostale dve vrste „*acalephae*“ grupe odvaja po širem posteriornom kraju petiolusa, naročito u poređenju sa *B. heraclei* (Slika 28d), ali i po tome što je distanca između primarnih i sekundarnih tuberkula veća nego kod pomenute dve vrste (*B. heraclei* i *B. brevicornis*). Na osnovu rezultata validacionog testa najsličnije petioluse poseduju vrste *B. heraclei* i *B. similis*, sa procentom ispravne klasifikacije od 76,19%, koji se razdvajaju na osnovu širine posteriornog dela petiolusa, koji je uži kod *B. heraclei*, i širine u nivou primarnih tuberkula (veća kod *B. similis*) (Slika 28o).



Slika 28. Promene u obliku petiolusa između parova vrsta na osnovu DA: (a) *B. acaelphae* – *B. angelicae*, (b) *B. acaelphae* – *B. brevicornis*, (c) *B. acaelphae* – *B. centaureae*, (d) *B. acaelphae* – *B. heraclei*, (e) *B. acaelphae* – *B. similis*, (f) *B. angelicae* – *B. brevicornis*, (g) *B. angelicae* – *B. centaureae*, (h) *B. angelicae* – *B. heraclei*, (i) *B. angelicae* – *B. similis*, (j) *B. brevicornis* – *B. centaureae*, (k) *B. brevicornis* – *B. heraclei*, (l) *B. brevicornis* – *B. similis*, (m) *B. centaureae* – *B. heraclei*, (n) *B. centaureae* – *B. similis*, (o) *B. heraclei* – *B. similis*.

Promene u obliku krila su manje uočljive u poređenju sa petiolusima. Vrednosti diskriminantne analize i validacionog testa su veoma visoke (oko 80%), što se smatra veoma visokim procentima korektne klasifikacije (Tabela 11). Vrsta koja se može odvojiti od svih ostalih je *B. similis*, koja poseduje najuža prednja krila sa veoma izduženim distalnim delom (Slika 29), pa su i procenti ispravne klasifikacije najveći, osim validacionog testa koji pokazuje najmanju vrednost za par *B. heraclei* – *B. similis* (79,16%). Ostale vrste imaju veoma slična krila, pri čemu se razlike javljaju u širini krila i dužini r&RS nerva. *Binodoxys centaureae* poseduje uža krila sa dužim r&RS nervom u odnosu na preostale četiri vrste, stoga su procenti ispravne klasifikacije veći od 90% (Tabela 11).



Slika 29. Promene u obliku krila između parova vrsta na osnovu DA: (a) *B. acalephae* – *B. angelicae*, (b) *B. acalephae* – *B. brevicornis*, (c) *B. acaelphae* – *B. centaureae*, (d) *B. acalephae* – *B. heraclei*, (e) *B. acalephae* – *B. similis*, (f) *B. angelicae* – *B. brevicornis*, (g) *B. angelicae* – *B. centaureae*, (h) *B. angelicae* – *B. heraclei*, (i) *B. angelicae* – *B. similis*, (j) *B. brevicornis* – *B. centaureae*, (k) *B. brevicornis* – *B. heraclei*, (l) *B. brevicornis* – *B. similis*, (m) *B. centaureae* – *B. heraclei*, (n) *B. centaureae* – *B. similis*, (o) *B. heraclei* – *B. similis*.

4.2 Molekularne analize

4.2.1 Ekstrakcija, amplifikacija i sekvenciranje DNK

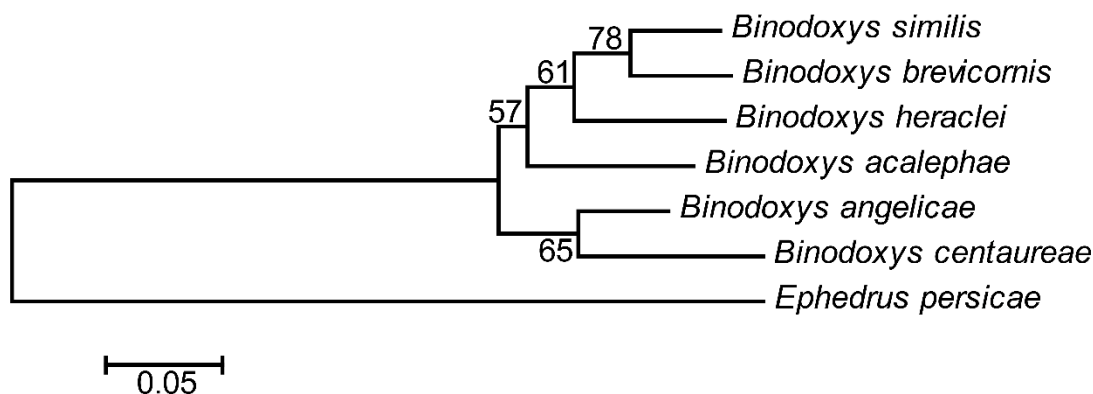
Sekvence su bile dužine od 570bp za vrstu *B. similis* do 585 bp koliko je sadržala sekvenca vrste *B. acalephae*. Najveći procenat nukleotida je utvrđen za timin, koji čini oko 45% sekvenci. Najmanje je zastupljen citozin, sa oko 10% učestalosti u sekvencama. Analizom sekvenci utvrđeno je 168 varijabilnih mesta od čega je 64 mesta informativno za parsimoniju. Sekvence *B. angelicae* i *B. centaureae* se na nekoliko mesta značajnih za parsimoniju razlikuju od preostalih analiziranih vrsta roda *Binodoxys*, što ukazuje na različite pravce evolutivne divergencije ove dve vrste (Tabela 12)

Tabela 12. Šema nukleotidnih supstitucija značajnih za parsimoniju

	27	76	91	196	197	211	409	415
<i>Binodoxys angelicae</i>	C	A	G	G	G	A	A	T
<i>Binodoxys centaureae</i>	C	A	G	G	G	A	A	T
<i>Binodoxys similis</i>	T	G	A	A	A	T	G	A
<i>Binodoxys heraclei</i>	T	G	A	A	A	T	G	A
<i>Binodoxys brevicornis</i>	T	G	A	A	A	T	G	A
<i>Binodoxys acalephae</i>	T	G	A	A	A	T	G	A
<i>Ephedrus persicae</i>	T	A	A	A	T	G	T	A

4.2.2 Filogenetska rekonstrukcija

Analizom sekvenci za COI gen, konstruisano je filogenetsko stablo metodom Maximum Likelihood koje ukazuje na postojanje dve filogenetske klade (Slika 30). Prvu kladu čine četiri vrste: *Binodoxys acalephae* koja se odvaja sa podrškom od 57%; zatim se odvaja vrsta *B. heraclei* koja je najsirodnija vrstama *B. brevicornis* i *B. similis*, koje čine jednu kladu. Drugu kladu čine dve vrste, *B. angelicae* i *B. centaureae*. Vrsta *Ephedrus persicae* je korišćena kao „outgroup“ takson pri rekonstrukciji filogenetskih odnosa.



Slika 30. Filogenetsko stablo evropskih vrsta roda *Binodoxys* konstruisano metodom Maximum Likelihood na osnovu sekvenci COI gena. Brojevi iznad grana predstavljaju *bootstrap* podršku.

Razlika između vrsta je kvantifikovana Kimurinim dvoparametarskim (K2P) distancama (Tabela 13). Na osnovu distanci, evropske vrste roda *Binodoxys* se dosta razlikuju. Kod vrste *B. centaureae* prosečna genetička distanca iznosi više od 11%, osim u poređenju sa *B. angelicae*, gde je genetička distanca 8,6%. Najveća razlika je uočena između vrsta *B. acalephae* i *B. centaureae* (12,1%), dok se najmanje genetički razlikuju *B. brevicornis* i *B. similis* (6,3%).

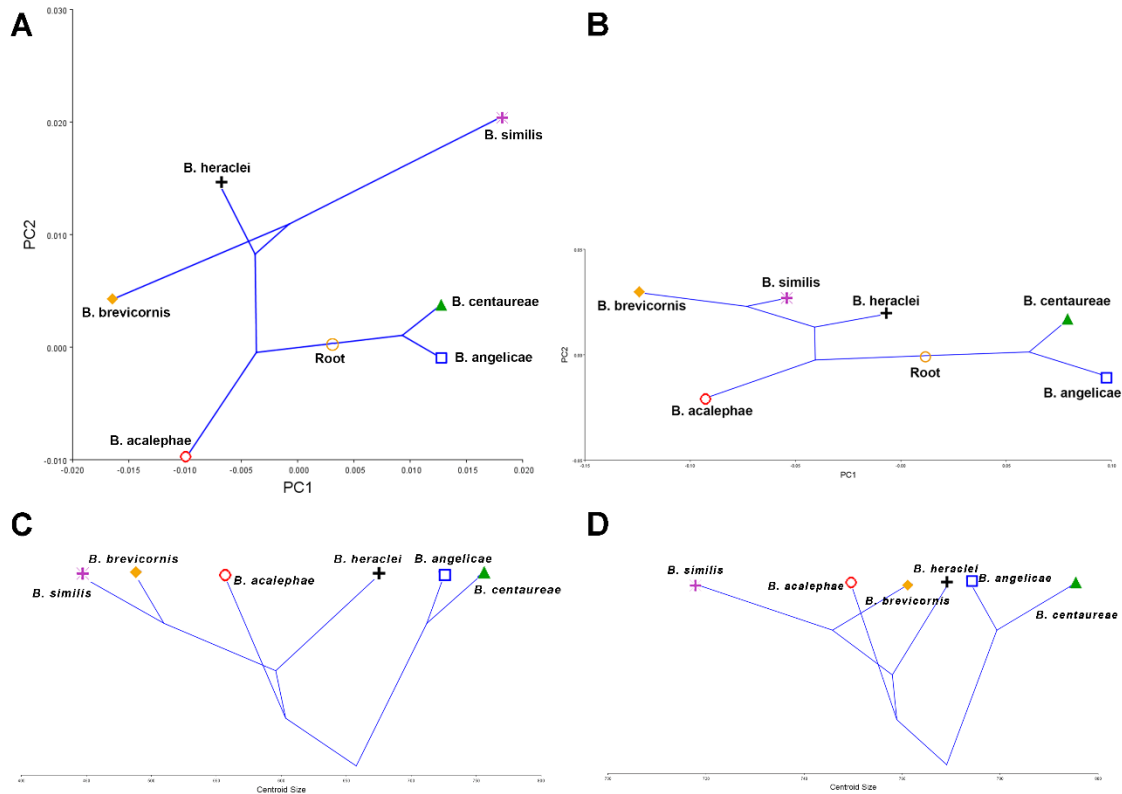
Tabela 13. Matrica K2P distanci unutar i između vrsta roda *Binodoxys*. Podvučene vrednosti označavaju unutargrupne genetičke distance.

	<i>B. acalephae</i>	<i>B. angelicae</i>	<i>B. brevicornis</i>	<i>B. centaureae</i>	<i>B. heraclei</i>	<i>B. similis</i>	<i>E. persicae</i>
<i>B. acalephae</i>							
<i>B. angelicae</i>	0,094						
<i>B. brevicornis</i>	0,098	0,102					
<i>B. centaureae</i>	0,121	0,086	0,119				
<i>B. heraclei</i>	0,088	0,106	0,086	0,115			
<i>B. similis</i>	0,09	0,106	0,063	0,117	0,08		
<i>E. persicae</i>	0,2	0,2	0,2	0,211	0,207	0,202	

4.3 Evolucionarne promene u obliku i veličini petiolusa i krila

Mapiranje rezultata filogenije na rezultate PCA obe analizirane strukture, pokazano je da postoje dve filogenetske i morfološke grupe u okviru analiziranih evropskih vrsta roda *Binodoxys*. Rezultati pokazuju da filogenetski signal postoji jedino za oblik petiolusa ($P = 0,0483$), gde se vrste *B. angelicae* i *B. centaureae* („*angelicae*“ grupa) izdvajaju po dužim i užim petiolusima kod kojih je intertuberkularna distanca veća (Slika 31A). Filogenetski signal za CS nije pokazao statističku značajnost u veličini petiolusa (Slika 31C)

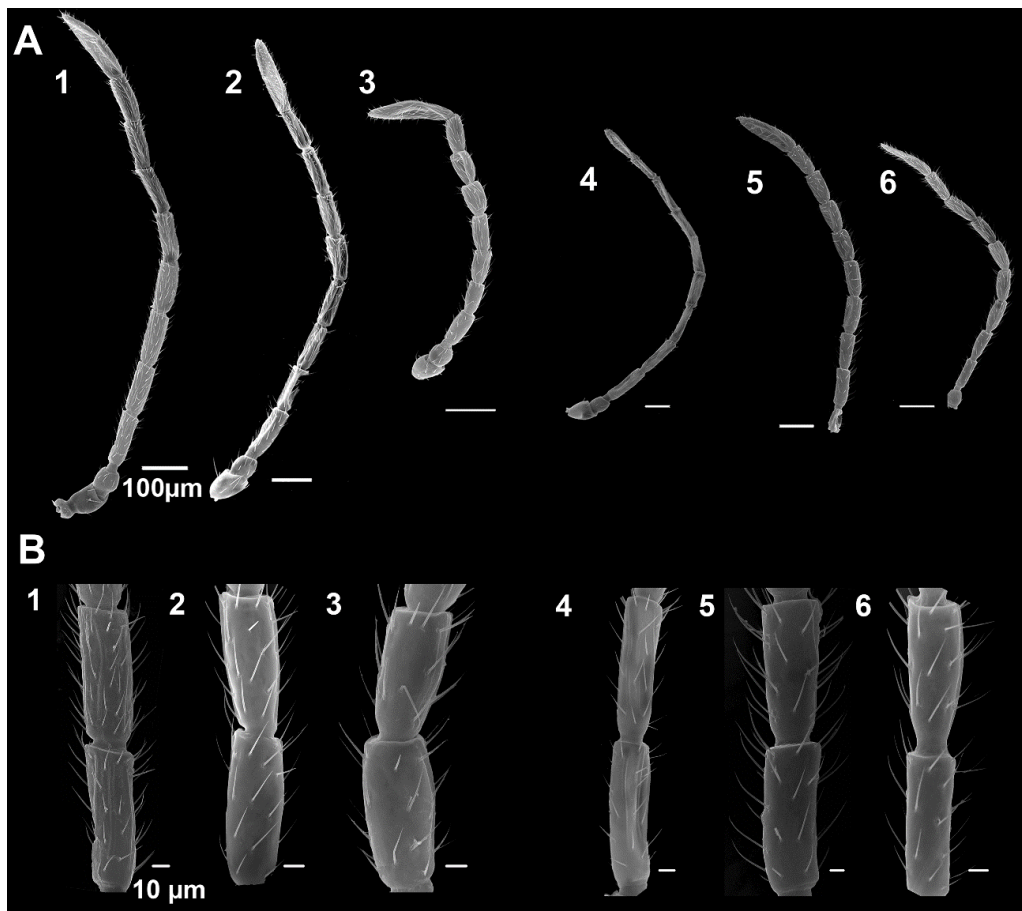
Filogenetski signal nije ukazao da su filogenetski srodnije vrste međusobno sličnije u obliku ($P=0.3699$) i veličini krila ($P=0.1889$) između analiziranih vrsta. Vrste „*angelicae*“ morfo grupe su ponovo grupisane zajedno, ali je na osnovu oblika krila *B. similis* sličnija ovoj grupi nego „*acalephae*“ grupi (Slika 31B i D).



Slika 31. Raspored vrsta u filo-morfoprostoru definisanom prvim dvema PC osama na osnovu morfologije petiolusa (A) i krila (B). Distribucija vrsta u odnosu na srednju veličinu petiolusa (C) i krila (D) nakon mapiranja filogenije.

4.4 Skening elektronska i svetlosna mikroskopija

Elektronska mikroskopija je pokazala razlike između vrsta. Broj flagelarnih segmenata antena odvaja vrstu *Binodoxys brevicornis* kod koje se javlja 8 segmenata, dok taj broj kod ostalih vrsta iznosi 9. Dužina antena i flagelarnih segmenata varira između vrsta. Tako najduže antene i flagelarne segmente ima *B. centaureae*, gde su prvi i drugi (F1 i F2) flagelarni segmenti skoro duplo duži od 100 μm . Dugački prvi i drugi flagelarni segment ima i *B. angelicae*. Kod vrste *B. brevicornis* antene su veoma kratke, sa F1 i F2 segmentima skoro loptastog oblika (Slika 32B). Apikalni segment antena je veoma dugačak kod vrste *B. brevicornis* u poređenju sa ostalim segmentima antene, dok je kod *B. centaureae* apikalni segment kraći od F1 segmenta.



Slika 32. Skening elektronska mikrografija (A) antene, (B) prva dva flagelarna segmenta ženki; 1) *B. acalephae*, 2) *B. angelicae*, 3) *B. brevicornis*, 4) *B. centaureae*, 5) *B. heraclei*, 6) *B. similis*.

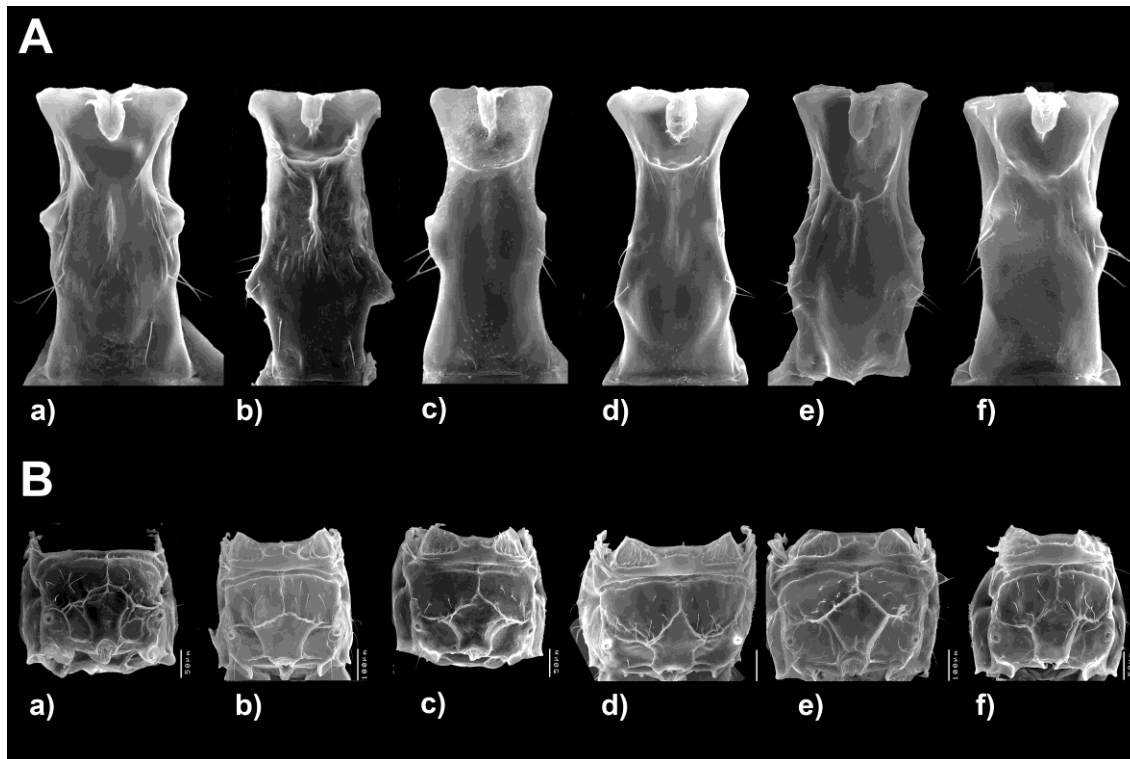
Pored antena, postoje razlike i u morfologiji glave. Naime, kod vrsta „*angelicae*“ morfo-grupe glava je izdužena i segmenti maksilarnih palpusa su uži (Slika 33). Pripadnici „*acalephae*“ morfo-grupe imaju okrugle glave, sa kraćim segmentima maksilarnih palpusa, naročito kod vrste *B. brevicornis* kod koje su segmenti palpusa skoro okrugli (Slika 33c). Na osnovu obojenosti glave, vrsta *B. heraclei* se može izdvojiti od ostalih predstavnika (Slika 33e), pošto je glava između očiju svetlija, dok je kod ostalih analiziranih vrsta glava uniformno obojena.



Slika 33. Morfologija glave kod ženki vrsta roda *Binodoxys*: a) *B. acalephae*, b) *B. angelicae*, c) *B. brevicornis*, d) *B. centaureae*, e) *B. heraclei* i f) *B. similis*.

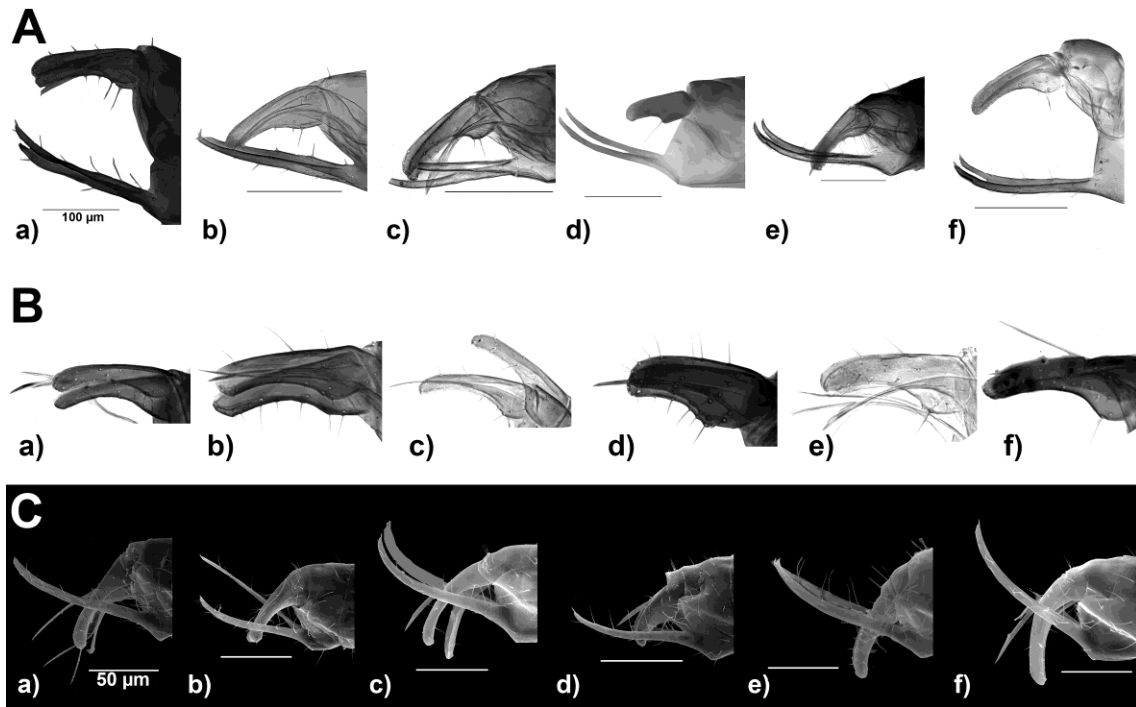
Elektronska mikrografija petiolusa otkrila je postojanje sitnih brazdi na posteriornom delu, koje su različito raspoređene kod vrsta (Slika 34). Tako na primer, kod *B. angelicae* ove brazde se prostiru sve do sekundarnih tuberkula, dok su kod *B. similis* postavljene najdalje od sekundarnih tuberkula. Najveći petiolusi su kod vrste *B. centaureae*, dok su najsitniji kod *B. similis*. Centralna brazda se javlja kod tri vrste: *B. acalephae*, *B. angelicae* i *B. heraclei*, ali se kod prve dve javljaju i dve dlake dorzalno na posteriornom delu petiolusa. Kod vrste *B. brevicornis* petiolus je najširi u nivou primarnih tuberkula. Velike intertuberkularne distance se uočavaju kod pripadnika „*angelicae*“ morfo-grupe, dok ovaj parametar veoma varira unutar „*acalephae*“ morfo-grupe.

Propodeum je karakteristično skulptuiran, tako da se može uočiti petougona centralna ćelija različitog oblika i veličine, koja kod predstavnika vrste *B. similis* nije u potpunosti zatvorena (Slika 34Bf). Kod ostalih vrsta, propodeum ne predstavlja informativan karakter za razdvajanje.



Slika 34. Skening elektronska mikrofografija (A) petiolusa i (B) propodeuma ženki vrsta: a) *B. acalephae*, b) *B. angelicae*, c) *B. brevicornis*, d) *B. centaureae*, e) *B. heraclei* i f) *B. similis*.

Morfologija ovipozitora i parnih nastavaka osmog abdominalnog sternita su različite za vrste (Slika 35). Najkraće i najšire korice ovipozitora se javljaju kod vrste *B. centaureae*, pripadnika „*angelicae*“ morfo-grupe (Slika 35Bd). Sa druge strane, *B. angelicae* ima nešto duže korice, ali svakako kraće i šire u poređenju sa predstavnicima „*acalephae*“ morfo-grupe, koji se odlikuju izduženim i tankim koricama ovipozitora. Nastavci poslednjeg abdominalnog sternita su različito građeni kod vrsta, pre svega se razlikuju u zakrivljenju, kao i broju seta koje se nalaze na dorzalnoj strani (Slika 34A, 33C). Najveći broj seta nose nastavci vrste *B. centaureae* (7), a sam nastavak ima blago zakrivljenje (Slika 35Cd). Nastavak je slične građe i kod *B. angelicae*, ali se sa dorzalne strane javlja 4-5 seta. *B. acalephae* i *B. similis* imaju skoro prave nastavke, dok su kod *B. heraclei* i *B. brevicornis* nastavci zakrivljeni.



Slika 35. Morfologija ovipozitora i korica ovipozitora vrsta roda *Binodoxys*: a) *B. acalephae*, b) *B. angelicae*, c) *B. brevicornis*, d) *B. centaureae*, e) *B. heraclei*, i f) *B. similis*.

5 Diskusija

Podfamilija Aphidiinae je jedna od bolje proučenih u okviru familije Braconidae. Geometrijska morfometrija je često korišćena metoda za poređenje razlika u obliku i veličini krila pripadnika podfamilije Aphidiinae. Kao jednu od razlika između vrsta rodova *Binodoxys* i *Trioxys*, Marsh i sar. (1987) su naveli razlike u nervaturi krila, odnosno da li je prva subdiskoidalna ćelija otvorena ili zatvorena. Analizom prednjih krila dve vrste roda *Trioxys* i četiri vrste roda *Binodoxys*, nije uočena navedena razlika. Kod svih analiziranih vrsta, ćelija koju navode Marsh i sar. (1987) je zatvorena. Sa druge strane, metodom geometrijske morfometrije primenjenom na prednjim krilim ukazuje da se rodovi mogu razlikovati po širini krila i dužini nerva radijalni sektor. Vrste roda *Binodoxys* imaju šira krila sa kraćim pomenutim nervom u poređenju sa krilima *Trioxys* vrsta.

Zbog velikog broja opisanih vrsta podfamilije Aphidiinae, koji stalno raste, rod *Binodoxys* je delimično zapostavljen, te su poslednja istraživanja roda bila šezdesetih, sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog veka (Mackauer, 1959a, 1959b, 1960; Starý, 1970, 1981c). Nakon toga su nove vrste roda *Binodoxys* opisivane ili detektovane kao pripadnici tritrofičkih asocijacija u državama širom sveta (Shuja-Uddin, 1973; Pike i sar., 1996, 2000a, 2000b; Akhart i Dey, 2011). Pojedine vrste razmatrane su kao biološki agensi za upotrebu u biološkoj kontroli; npr. *B. brevicornis* kao potencijalni agens u biološkoj kontroli *Brachycorynella asparagi*, kao i *B. communis* u kontroli *Aphis glycines*, značajne štetočine soje u Sjedinjenim Američkim Državama (Starý, 1990; Aspelen i sar., 2011).

Kao najčešća taksonomska karakteristika za razlikovanje *Bindoxys* vrsta koriste se položaji primarnih i sekundarnih tuberkula petiolusa (Mackauer 1959a, 1960), broj seta na viljuškastim nastavcima legalica ženki, kao i sam oblik nastavaka (Starý, 1981c). U okviru ove studije, analizirajući oblik dorzalne strane petiolusa, odnosno položaja tuberkula na petiolusu, razlikuju se dve morfološke grupe u okviru šest evropskih vrsta roda *Bindoxys*. Grupa kod koje su primarne (spirakularne) i sekundarne tuberkule jasno razdvojene označena je kao „*angelicae*“ morfo-grupa, gde se nalaze dve vrste – *B. angelicae*, na osnovu koje je grupa i dobila ime, i *B. centaureae*. Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da petiolusi „*angelicae*“ morfo-grupe su izduženi, distanca između primarnih i sekundarnih tuberkula je veća od širine petiolusa u nivou tuberkula, i posteriorni deo petiolusa (deo kojim se petiolus nastavlja na drugi metazomalni segment) je uži od

širine u nivou primarnih ili sekundarnih tuberkula. Sa druge strane, vrste koje imaju kratke i široke petioluse, kod kojih je distance između primarnih i sekundarnih tuberkula manja od širine segmenta u nivou spirakularnih tuberkula pripadaju „*acalephae*“ morfo-grupu, koju čine *B. acalephae*, *B. brevicornis*, *B. heraclei* i *B. similis*. U okviru ove morfo-grupe, vrste se mogu razlikovati na osnovu distance između primarnih i sekundarnih tuberkula (dps), kao i na osnovu širine petiolusa u nivou primarnih tuberkula. *Binodoxys brevicornis* se izdvaja kao vrsta kod koje je distanca između primarnih i sekundarnih tuberkula na petiolusu najmanja i širina u nivou spirakularnih (wp) i sekundarnih tuberkula (ws) je približno ista. Na osnovu ovih karakteristika petiolusi vrste *B. brevicornis* su slične građe petiolusima vrsta roda *Trioxys*. Takođe, petiolusi pomenute vrste su jedni od najmanjih. Najveću distancu između primarnih i sekundarnih tuberkula u okviru „*acalephae*“ grupe poseduju petiolusi vrste *B. heraclei*, koji su ujedno i najveći u okviru ove grupe. Najmanji petiolus se javlja kod *B. similis* po čemu je blizak petiolusu vrste *B. brevicornis*, ali se jasno razlikuju po obliku i dps distanci. Na osnovu oblika petiolusa, odnosno dps, wp i ws distanci, kao i širine posteriornog kraja, petiolusi vrste *B. similis* su slični onima kod *B. heraclei*, ali se diskriminantnom analizom uočavaju razlike u širini posteriornog kraja i širini u nivou primarnih tuberkula. Najširi posteriorni kraj petiolusa je prisutan kod vrste *B. acalephae*, koja se ujedno odlikuje i većom distancom između primarnih i sekundarnih tuberkula u poređenju sa *B. brevicornis* vrstom. Dobro razdvajanje vrsta potvrđuju i rezultati diskriminante analize sa visokim procentima korektne klasifikacije (pozvati se na tabelu u kojoj se nalaze rezultati) kada se porede parovi vrsta. Takođe, visoke procenete korektne klasifikacije pokazuju rezultati validacionog testa, što potvrđuje postojanje dve morfološki jasno odvojene grupe vrsta.

Rezultati ove doktorske teze ukazuju na postojanje razlika u obliku i nervaturi krila, ali da su one manje u poređenju sa razlikama koje se javljaju u obliku petiolusa. Morfologija krila razdvaja vrste na dve grupe. Analiza glavnih komponenti (PCA) sa jedne strane grupiše pripadnike „*angelicae*“ morfo-grupe i *B. similis* iz „*acalephae*“ grupe, dok se sa druge strane nalaze ostali pripadnici „*acalephae*“ morfo-grupe (*B. acalephae*, *B. brevicornis* i *B. heraclei*). Pripadnici „*angelicae*“ grupe imaju uža krila sa dužim radijalnim i r&RS nervom. Ove tri vrste se mogu razlikovati po tome što *B. similis* ima izdužen distalni deo krila i najmanja krila, dok druge dve vrste imaju najveća krila. *B. centaureae* i *B. angelicae* međusobno se razlikuju po tome što su krila *B. centaureae* nešto izduženija (pogotovo u distalnom delu) i sa kraćim radijalnim i r&Rs nervom u poređenju sa krilima *B. angelicae* vrste. Krila „*acalephae*“ grupe se razlikuju u distalnom delu,

koji je kod *B. acalephae* kratak, dok je najduži kod *B. heraclei*. Kanonijska diskriminantna analiza izdvaja krila vrste *B. acalephae* sa kratkim r&Rs nervom i dugačkim radijalnim nervom, *B. brevicornis* sa širokim krilima i *B. centaureae* sa uskim krilima. Sa druge strane, preostale tri vrste (*B. angelicae*, *B. heraclei* i *B. similis*) se odlikuju dugačkim r&RS nervom i kratkim radijalnim nervom, pri čemu se *B. similis* izdvaja od druge dve po izduženom distalnom delu krila. Rezultati diskriminantne analize potvrđuju postojanje razlika u obliku i nervaturi krila, pri čemu su procenti ispravne klasifikacije manji u poređenju sa petiolusima.

Podfamilija Aphidiinae je često analizirana molekularnim metodama, pri čemu su razjašnjavani filogenetski odnosi različitih taksonomskih kategorija primenom različitih markera. Takođe, molekularne analize se koriste kao potvrda morfološkim analizama prilikom opisivanja nove vrste. U ovom radu, na osnovu COI gena identifikovane su vrste, ali i odnosi između šest evropskih vrsta. Potvrđeno je postojanje dve ranije opisane filogenetske grupe: „*angelicae*“ i „*acalephae*“ (Mackauer, 1959a). Takođe, potvrđeno je postojanje vrste *B. similis*, koja je od opisivanja od strane Mackauer-a zabeležena svega nekoliko puta. Iako je vrsta rasprostranjena samo u nekoliko evropskih zemalja, smatra se da ima mnogo širu distribuciju, ali je zbog slabog taksonomskog poznavanja roda *Binodoxys* često pogrešno identifikovana. Ostale analizirane vrste se jasno izdvajaju na filogenetskom stablu i genetičke distance su velike, što ukazuje da se radi o dobrim vrstama. Pošto je korišćen samo jedan molekularni marker (COI), tumačenje rezultata treba uzeti sa oprezom. Naime, za potvrdu vrsta rodova koji su filogenetski mlađi, kao što je slučaj sa rodom *Binodoxys*, neophodna je analiza nekoliko molekularnih markera. Međutim, u većini analiza podfamilije Aphidiinae, vrste roda *Binodoxys* nisu uključivane ili je uključen mali broj vrsta. Iako su *B. acalephae* i *B. angelicae* morfološki razdvojene veoma davno (vrsta *B. acalephae* je opisao Marshall 1890 na osnovu mužjaka), Mescheloff i Rosen (1993) navode da je *B. acalephae* sinonim *B. angelicae*. Međutim sekvenciranjem gena za NADH1 dehidrogenazu, Smith i sar. (1999) potvrdili postojanje dve vrste. Upotrebom 16S rRNK Kambhampati i sar (2000) su u pokazali da su vrste *B. angelicae* i *B. centaureae* grupisane u jednu kladu, dok se u drugoj nalazi *B. acalephae*. Analiziranjem odnosa *Binodoxys* i *Trioxys* vrsta primenom COI gena, Čkrkić i sar. (2019) molekularnim metodama potvrđuju status pet analiziranih vrsta roda *Binodoxys*, kao i dve filogenetske linije. Međutim, Na osnovu svih urađenih analiza, status vrsta *B. acalephae*, *B. angelicae* i *B. centaureae* je potvrđen upotrebom dva ili tri molekularna gena.

Skening elektronska mikroskopija je ukazala na postojanje razlika između dve morfo-grupe. Pripadnici „*angelicae*“ morfo-grupe imaju izdužene glave na kojima se nalaze dugačke antene sa izduženim F1 i F2 segmentima. Petiolusi su izduženi sa uskim posteriornim delom i velikim razmakom između primarnih i sekundarnih tuberkula, koji je veći od distance u nivou primarnih tuberkula. U okviru ove grupe, i građa legalice je takođe karakteristična; legalica i korice legalice su kratke, dok su viljuškasti nastavci dugački i nose 4-5 (*B. angelicae*) ili 7 (*B. centaureae*) seta sa dorzalne strane. U okviru „*acalephae*“ morfogrupe, vrste se odlikuju širokim, skoro okruglim glavama sa kraćim antenama, čiji F1 i F2 segmenti mogu biti veoma kratki, kao na primer kod vrste *B. brevicornis*. Takođe, u okviru „*acalephae*“ morfo-grupe obojenost glavenog regiona je uniformna, osim kod *B. heraclei*. Petiolusi su kratki i široki, sa blisko postavljenim tuberkulama, dok su legalice dugačke, a viljuškasti nastavci kratki u poređenju sa koricama legalice.

Zbog postojanja evidentnih razlika u obliku i veličini petiolusa analiziranih vrsta roda *Binodoxys* može se zaključiti da je došlo do divergencije u rodu. Sa jedne strane se nalaze vrste kod kojih su petiolusi dugački i uski sa udaljenim primarnim i sekundarnim tuberkulama. Ove vrste se odlikuju i većim petiolusima. Drugu grupu čine četiri vrste (*B. acalephae*, *B. brevicornis*, *B. heraclei* i *B. similis*), kod kojih su petiolusi kratki, široki i sa blisko postavljenim tuberkulama. Razlog javljanja divergencije još uvek nije poznat, ali kako je petiolus značajna struktura prilikom parazitiranja vaši, postoji mogućnost da je došlo do razdvajanja vrsta kao odgovor na parazitiranje određene grupe ili određenog stupnja biljnih vaši. Filogenetski signal nije pokazao da srodnije vrste imaju sličan oblik krila, iako su vrste *B. angelicae* i *B. centaureae* ponovo grupisane zajedno. Pošto je vrsta *B. similis* morfološki sličnija u obliku krila prethodno pomenutim vrstama, a molekularno vrsti *B. brevicornis*, filogenetski signal nije statistički značajan. Vrsta *B. similis* je najmanje zastupljena u analiziranom uzorku, ali je takođe i najmanje proučena vrsta, tako da za sada razlog njenog grupisanja sa vrstama „*angelicae*“ grupe nije moguće utvrditi.

Da veličina domaćina utiče na veličinu parazitoidea, a samim tim i na veličinu svih delova tela pokazali su Villegas i sar. (2017). Oni su uočili da kod vrste *Aphidius ervi* postoje razlike u veličini i obliku krila uslovljene različitim domaćinima koje parazitoid napada. Tako je kod krupnijih vrsta biljnih vaši detektovano da su krila parazitoidea veća. Na osnovu podataka ove studije, može se pretpostaviti da su se u analizi javile velike razlike unutar vrsta zbog različitih domaćina sa koji su sakupljane vrste. Zbog ove konstatacije, moguće je da su opsezi variranja

veliĉine krila i petiolusa unutar grupa veći u poređenju sa variranjem između grupa, odnosno vrsta. Stoga, filogenetski signal nije pokazao statistiĉki znaĉajne rezultate, odnosno filogenetski srodnije grupe ne pokazuju sliĉnost u veliĉini krila.

Primenom geometrijske morfometrije ukazano je da pored petiolusa, prednja krila su taksonomski karakter za razdvajanje *Binodoxys* i *Trixoxys* vrsta. Međutim, da bi se ovaj karakter uključio u taksonomske kljuĉeve, neophodno je analizirati veći uzorak, odnosno u analizu uključiti više vrsta oba roda. Petiolus se pokazao kao dobar taksonomski karakter za razdvajanje na specijskom nivou unutar *Binodoxys* roda. Pored distance između primarnih i sekundarnih tuberkula petiolusa i širine u nivou primarnih tuberkula, kao ĉesto korišćenih karakteristika u kljuĉevima za identifikaciju, ovom analizom je ukazano na potrebu da se širina u nivou sekundarnih tuberkula i širina posteriornog dela petiolusa ubace u kljuĉeve za identifikaciju. Sa druge strane, krila analiziranih vrsta roda *Binodoxys* nisu toliko informativna, kao u nekim drugim rodovima afidiina. Takođe, analizirajući ostale morfološke strukture, može se zakljuĉiti da je oblik i veliĉina ovipozitora znaĉajan taksonomski karakter.

6 Zaključci

1. Krila predstavljaju taksonomski karakter za razdvajanje vrsta rodova *Binodoxys* i *Trioxys*. Prednja krila *Binodoxys* vrsta su šira i sa kraćim nervom radijalni sektor.
2. Petiolus je najznačajniji taksonomski karakter, koji deli evropske vrste roda *Binodoxys* na dve grupe: „*angelicae*“ i „*acalephae*“. Dve vrste, *B. angelicae* i *B. centaureae* su grupisane u „*angelicae*“ morfogrupu i odlikuju se dugačkim, uskim petiolusima na kojima su primarne i tuberkule jasno odvojene, a posteriorni deo je uzak. Međusobno se razdvajaju na osnovu širine u nivou sekundarnih tuberkula; petiolusi *B. centaureae* su najširi u nivou sekundarnih tuberkula. U „*acalephae*“ grupi su preostale četiri vrste, koje se odlikuju kratkim i širokim petiolusima kod kojih veoma varira intertuberkularna distanca. Najmanja distanca je kod vrste *B. brevicornis*, dok se najveća distanca javlja kod vrste *B. heraclei*.
3. Geometrijska morfologija krila je pokazala da oblik i veličina krila nisu veoma informativne za razdvajanje *Binodoxys* vrsta. Razlike postoje, ali su veoma male i teško se mogu uključiti u ključeve za determinaciju vrsta.
4. Analiza mitohondrijskog gena za citohrom oksidazu (COI) potvrdila je postojanje dve filogenetske grupe: „*angelicae*“ i „*acalephae*“. Prva klada grupiše dve vrste, *B. angelicae* i *B. centaureae*, dok se u drugoj filogenetskoj liniji nalaze četiri vrste (*B. acalephae*, *B. brevicornis*, *B. heraclei* i *B. similis*). Na osnovu genetičkih distanci utvrđeno je da su svi analizirani taksoni „dobre vrste“.
5. Mapiranjem filogenije na morfologiju uočeno je da filogenetski srodne vrste, *B. angelicae* i *B. centaureae* imaju sličan oblik petiolusa, ali ne i krila.
6. Analiziranjem filogenetskog signala na veličinu petiolusa i krila utvrđeno je da filogenetski srodnije vrste nemaju petioluse i krila slične veličine.
7. Skening elektronskom i svetlosnom mikroskopijom potvrđeno je postojanje razlika između filogenetskih grupa, ne samo u obliku petiolusa, nego i obliku glave, veličini antena i prva dva flagelarna segmenta antena, kao i dužini legalice. „*Angelicae*“ grupa obuhvata vrste kod kojih su glava i petiolusi izduženi, dok su legalice kraće. Vrste „*acalephae*“ grupe se odlikuju kraćim petiolusima u poređenju sa *B. angelicae* i *B. centaureae*, ali imaju duže legalice.

8. Daljim istraživanjima trebalo bi uključiti preostale dve evropske vrste (*B. genistae* i *B. minutus*) i utvrditi kojoj morfo-grupi pripadaju i da li su u pitanju sinonimi već postojećih vrsta.

7 Ključ za identifikaciju evropskih vrsta roda *Binodoxys*

1. Primarne i sekundarne tuberkule petiolusa jasno razdvojene; odnos dps/wp je pozitivan; petiolus se sa drugim metazomalnim segmentom usko spaja (Slika 34Ab,d); glava izdužena (Slika 33); antene sa dugačkim F1 i F2 segmentom (Slika 32); korice ovipozitora kratke (Slika 35Bb,d) („*angelicae*“ morfo-grupa) 2
 - Primarne i sekundarne tuberkule blisko pozicionirane; odnos dps/wp negativan; petiolus je posteriorno širok (Slika 34A); glava je široka (Slika 33); antene su sa kratkim F1 i F2 segmentima (Slika 32); korice ovipozitora dugačke (Slika 35Bb,d) („*acalephae*“ morfogrupa) 3
2. Širina između primarnih tuberkula je skoro ista kao širina između sekundarnih tuberkula (Slika 33Ab); na parnim nastavcima legalice sa dorzalne strane nalazi se 3-4 dugačkih seta (Slika 35Cb)..... *angelicae* (Haliday 1833)
 - Širina petiolusa u nivou sekundarnih tuberkula je skoro duplo veća nego u nivou primarnih tuberkula (Slika 34Ad); parni nastavci legalice nose po 7-8 dugačkih dorzalnih seta (Slika 35Cd)..... *centaureae* (Haliday 1833)
3. Uočljive su primarne i sekundarne tuberkule na petiolusu, antene su izgrađene od 11 segmenata kod ženki, odnosno 13 kod mužjaka 4
 - Primarne i sekundarne tuberkule veoma blizu pozicionirane, izgleda kao da je jedan par tuberkula 7
4. Petiolus širok i kratak; širina u nivou primarnih tuberkula je identična širini u nivou sekundarnih tuberkula; anteriorni deo petiolusa veoma širok (Slika 34Aa) *acalephae* (Marshall 1896)
 - Petiolus izdužen i uzak; primarne i sekundarne tuberkule su pozicionirane u prve 2/3 segmenta 5
5. Glava je ispod antena žute boje (Slika 33e) *heraclei* (Haliday 1833)
 - Glava je braon boje 6
6. Ženke su tamno obojene; na kuspisima volsela edeagusa nalaze se tri dugačke dlake, dok se na paramerama nalazi 9 dlaka (Slika 16a) *genistae* (Mackauer 1960)

- Bazni članci antena, petiolus i noge svetlije obojeni; na volseli aedeagusa nalaze se dve dugačke dlake, dok se na digitusu nalazi šest dlaka (Slika 16b)..... *similis* Mackauer 1959
- 7. Antene su izgrađene od 10 segmenata kod ženki, odnosno 12 kod mužjaka *brevicornis* (Haliday 1833)
- Antene su izgrađene od 11 segmenata kod ženki, odnosno 13 kod mužjaka *minutus* (Haliday 1833)

8 Literatura

- Akhart, M.S., Dey, D., Usmani, M.K., 2011. A catalogue of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) from India. *Insecta Mundi*, 0151: 1-3.
- Antrique, A., Starý, P., Ntahimpera, L., 1989. Biological control of pest aphids by hymenopterous parasitoids in Burundi. *FAO Plant Protection Bulletin*, 37: 71-74.
- Aripov, Sh. T., 2003. The composition of the Aphidiidae species (the parasites of aphids) in Uzbekistan. *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal*, 3-4: 86-90. [In Russian with English summary]
- Austin, A., Dowton, M., 2000. *Hymenoptera: Evolution, biodiversity, and biological control*. CSIRO, Canberra.
- Beckage, N.E., Gelman, D.B., 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: implication for new biologically based strategy for insect control. *Annual Review of Entomology*, 49: 299-330. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123324>
- Beirne, B.P., 1942. Observations on the developmental stages of some Aphidiinae (Hym., Braconidae). *Entomologist's Monthly Magazine*, 78: 283-286.
- Belshaw, R., Quicke, D.L.J., 1997. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 281-293. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0400>
- Belshaw, R., Quicke, D.L.J., 2002. Robustness of ancestral state estimates: evolution of life history strategy in ichneumonid parasitoids. *Systematic Biology*, 51: 450-477. <https://doi.org/10.1080/10635150290069896>
- Belshaw, R., Dowton, M., Quicke, D.L.J., Auston, A.D., 2000. Estimating ancestral geographical distribution: a Godwanan origin for aphids parasitoids? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1442): 491-496. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1027>

- Benoit, P.L.G., 1955. Contributions à l'étude de la faune entomologique de Ruanda-Urundi (Missions P. Basilewsky 1953). XXXIX. Hymenoptera Aphidiidae. *Annales du Musée Royal du Congo Belge, Sciences Zoologiques*, 36: 347-351.
- Bhagatt, R.C., 1984. New records and hosts of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) from Kashmir, India. *Journal of the Bombay Natural History Society*, 81: 93-98.
- Blackman, R.L., Eastop, V.F., 2000. *Aphids on the world's crops: an identification and information guide* (No. Ed. 2). John Wiley & Sons Ltd., 1460 pp.
- Chaubet, B., Derocles, S.A.P., Hullé, M., Le Relac, A., Outreman, Y., Simon, J-C, Tomanović, Ž., 2013. Two new species of aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) from the high arctic (Spitsbergen, Svalbard). *Zoologischer Anzeiger*, 252: 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2012.03.001>
- Chen, J.H., Shi, Q.X., 2001. *Systematic studies on Aphidiidae of China (Hymenoptera: Aphidiidae)*. Fujian Science and Technology Publishing House, Fujian. 273 pp.
- Chou, L., 1984. The phylogeny of Aphidiidae (Hymenoptera) of Taiwan. *Journal of agricultural research of China*, 33: 437-446.
- Čkrkić, J., Petrović, A., Kocić, K., Ye, Z., Vollhardt, I.M.G., Hebert, P.D.N., Traugott, M., Tomanović, Ž., 2019. Hidden in plain sight: phylogeography of an overlooked parasitoid species *Trioxys sunnysidensis* Fulbright & Pike (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Agricultural and Forest Entomology*, <https://doi.org/10.1111/afe.12332>
- Clausen, C.P., 1978. *Introduced parasites and predators of arthropod pests and weeds: a world review* [Biological control, economic plants]. Agricultural Handbook - US Department of Agriculture. No. 480. USDA, ARS, Washington, DC.
- Davidian, E.M., 2005. A new species of the genus *Betuloxys* Mackauer from European Russia (Hymenoptera: Aphidiidae). *Zoosystematica Rossica*, 14(1): 127-128.

- Davidian, E.M., 2007. Aphidiidae [in Russian]. In Lelej A.S. (Ed.) *Key to the insects of Russia Far East. Vol. IV. Neuropteroidea, Mecoptera, Hymenoptera*. Vladivostok, Dalnauka, pp. 192-254.
- Davidian, E.M., 2016. A new genus and new species of subfamily Trioxinae (Hymenoptera: Aphidiinae) from the Far East of Russia. *Zootaxa*, <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4205.5.5>
- Delphino, M.A., Stary, P., 2004. *Uroleucon bereticum* (E.E. Blanchard) (Hemiptera: Aphididae) and its new endemic parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae) in Argentina. *Neotropical Entomology*, 33(5): 577-581. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000500006>
- Derocles, S.A., Plantegenest, M., Simon, J.C., Taberlet, P., Le Relec, A., 2012. A universal method for detection and identification of Aphidiinae parasitoids within their aphid host. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 634-645. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03131.x>
- Derocles, S.A., Plantegenest, M., Rasplus, J.Y., Marie, A., Evans, D.M., Lunt, D.H., Le Ralec, A., 2016. Are generalist Aphidiinae (Hym. Braconidae) mostly cryptic species complexes? *Systematic Entomology*: 41: 379-391. <https://doi.org/10.1111/syen.12160>
- Dey, D., Akhart, M.S., 2007. Diversity of natural enemies of aphids belonging to Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) in India. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 10: 281-296. [https://doi.org/10.1016/S1226-8615\(08\)60364-7](https://doi.org/10.1016/S1226-8615(08)60364-7)
- Dixon, A.F.G., Kindlmann, P., Lepš, J., Holman, J., 1987. Why are there so few species of aphids, especially in the tropics. *The American Naturalist*, 129: 580-592.
- Dowton, M., Austin, A.D., Antolin, M.F., 1998. Evolutionary relationships among Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16S rDNA gene sequences. *Insect Molecular Biology*, 7: 129-150. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1998.72058.x>
- Dryden, I.L., Mardia, K.M., 1998. *Statistical Shape Analysis*. New York: Wiley.
- Dunne, T.T., Stone, M., 1993. Datedating the Moore-Penrose generalized inverse for cross-validation of centroid least squares predictions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 55:369-375.

- Edson, K.M., Vinson, S.B., 1979. A comparative morphology of the venom apparatus of female braconids (Hymenoptera: Braconidae). *The Canadian Entomologist*, 111: 1013-1024.
- Fernandez-Triana, J., Buffam, J., Beaudin, M., Davis, H., Fernandez-Galliano, A., Griffin, E., Lin, S-Y, McAulay, M.K., Richter, R., Rodriguez, F., Várkonyi, G., 2017. An annotated and illustrated checklist of Microgastrinae wasps (Hymenoptera, Braconidae) from the Canadian Arctic Archipelago and Greenland. *Zookeys*, 691: 49-101. <https://doi.org/10.3897/zookeys.691.14491>
- Finlayson, T., 1990. The systematics and taxonomy of final instar larvae of the family Aphidiidae (Hymenoptera). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 152: 3-74.
- Fleschner, C.A., 1963. Releases of recently imported insect parasites and predators in California, 1960-1961. *Pan-Pacific Entomologist*, 39(2): 114-116.
- Frost, S.R., Marcus, L.F., Bookstein, F.L., Reddy, D.P., Delson, E., 2003. Cranial allometry, phylogeography, and systematics of large-bodied papionins (Primates: Cercopithecinae) inferred from geometric morphometric analysis of landmark data. *The Anatomical Record part A*, 275A: 1048-1072. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10112>
- Fulmek, L., 1968. Parasitinsekten der Insektengallen Europas. *Beiträge zur Entomologie*, 18(7/8): 719-952.
- Gauld, I.D., 1988 Evolutionary patterns of host utilization by ichneumonoid parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae and Braconidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 35: 351-377. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1988.tb00476.x>
- Gärdenfors, U., 1986. Taxonomic and biological revision of *Ephedrus* (Haliday) (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Entomologica Scandinavica Supplement*, 27: 1-95.
- Haliday, A.D., 1833. An essay on the classification of the parasitic Hymenoptera of Britain, which correspond with the Ichneumones minuti of Linnaeus. *Entomological Magazine*, London 1: 259-276.
- Herniou, E.A., Huguet, E., Théyé, J., Bézier, A., Periquet, G., Drezen, J-M., 2013. When parasitic wasps hijacked viruses: genomic and functional evolution of polydnaviruses. *Philosophical*

Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences, 368: 20130051.
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0051>

Huber, J.T., 1986. Systematics, biology, and hosts of the Mymaridae and Mymarommatidae (Insecta: Hymenoptera): 1758-1984. *Entomography*, 4: 185-243.

Ilić Milošević, M., Petrović, A., Stanković, S.S., Čkrkić, J., Starý, P., Žikić, V., Tomanović, Ž., 2015. Taxonomic Position and Phylogenetic Relationships of the Genera and Species *Euaphidius* and *Remaudierea* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) Analyzed Using Molecular Markers and Geometric Morphometrics. *Annals of the Entomological Society of America*, 108: 435-445. <https://doi.org/10.1093/aesa/sav018>

Jones, O.R., Purvis, A., Baumgart, E., Quicke, D.L.J., 2009. Using taxonomic revision data to estimate the geographic and taxonomic distribution of undescribed species richness in the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Insect Conservation and Diversity*, 2: 204-212. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2009.00057.x>

Kambhampati, S., Völkl, W. and Mackauer, M., 2000. Phylogenetic relationships among genera of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) based on DNA sequence of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Systematic entomology*, 25: 437–445. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.2000.00129.x>

Kavallieratos, N.G., Tomanović, Ž., Starý, P., Athanassiou, C.G., Sarlis, G.P., Petrović, O., Niketić, M., Anagnou-Veroniki, M., 2004. A survey of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Southeastern Europe and their aphid – plant associations. *Applied Entomology and Zoology*, 39: 527–563. <https://doi.org/10.1303/aez.2004.527>

Klingenberg, C.P., 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary changes in ontogeny. *Biological Reviews*, 73: 79-123.

Klingenberg, C.P., 2002. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*, 287: 3-10. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00867-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00867-8)

- Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Klingenberg, C.P., 2016. Size, shape, and form: concept of allometry in geometric morphometrics. *Developmental Genes and Evolution*, 226: 113-137. <https://doi.org/10.1007/s00427-016-0539-2>
- Klingenberg, C.P., McIntyre, G.S., 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, 52: 1363-1375. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb02018.x>
- Klingenberg, C.P., Monteiro, L.R., 2005. Distances and Directions in Multidimensional Shape Spaces: Implication for Morphometric Application. *Systematic Biology*, 54: 678-688. <https://doi.org/10.1080/10635150590947258>
- Klingenberg, C.P., Gidaszewski, N.A., 2010. Testing and quantifying phylogenetic signals and homoplasy in morphometric data. *Systematic Biology*, 59: 245-261. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp106>
- Klingenberg, C.P., Barluenga, M., Meyer, A., 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, 56: 1909-1920. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00117.x>
- Kula, R.R., Johnson, P.J., Heidel-Baker, T.T., Boe, A., 2017. A new species of *Acanthocaudus* Smith (Braconidae: Aphidiinae), with a key to species and new host and distribution records for aphidiines associated with *Silphium perfoliatum* L. (Asterales: Asteraceae). *Zootaxa*, 4263: 543-552. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4236.3.8>
- Lee, J.E., Slabber, S., Jansen van Vuuren, B., van Noort, S., 2007. Colonisation of sub-Antarctic Marion Islands by a non-indigenous aphid parasitoid *Aphidius matricariae* (Hymenoptera, Braconidae). *Polar Biology*, 30: 1195-1201. <https://doi.org/10.1007/s00300-007-0277-z>

- Lewis, C.N., Whitfield, J.B., 1999. Braconid wasp (Hymenoptera: Braconidae) diversity in forest plots under different silvicultural methods. *Environmental Entomology*, 28: 986-997. <https://doi.org/10.1093/ee/28.6.986>
- Loni, A., Samartsev, K.G., Scaramozzino, P.L., Belokobyl'sij, S.A., Lucchi, A., 2016. Braconinae parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) emerged from larvae of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae) feeding on *Daphne gnidium* L. *ZooKeys*, 587: 125-150. <https://doi.org/10.3897/zookeys.587.8478>
- Mackauer, M., 1959a. *Trioxys similis* n. sp. (Hym. Braconidae, Aphidiinae), eine neue Blattlaus-Schlupfwespe aus Frankreich. Nebst einigen biocönologischen und nomenklatorischen Bemerkungen. *Entomophaga*. 4, 303-309.
- Mackauer, M., 1959b. Die mittel-, west- und nordeuropäischen Arten der Gattung *Trioxys* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Beiträge zur Entomologie*, 9: 144-179.
- Mackauer, M., 1960. Zur Systematik der Gattung *Trioxys* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Beiträge zur Entomologie*, 10, 137-160.
- Mackauer, M., 1961. Die Gattung der Familie Aphidiidae und ihre verwandtschaftlich Zuordnung (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Beiträge zur Entomologie*, 11: 792-803.
- Mackauer, M., 1962. A new genus of Aphidiidae (Hymenoptera) from northern Canada. *Canadian Entomologist*, 94, 1107-1109.
- Mackenzie, A., Dixon, A.F.G., Kindlman, P., 1994. The relationship between the regional number of aphid species and plant species diversity. *European Journal of Entomology*, 91: 135-138.
- Marsh, P.M., Shaw, S.R., Wharton, R.A., 1987. *An identification manual for the North American genera of the family Braconidae (Hymenoptera)*. Memoirs of the Entomological Society of Washington, (13). 98pp.
- Mescheloff, E., Rosen, D., 1993. Biosystematic studies on the Aphidiidae of Israel (Hymenoptera: Ichneumonoidea). 5. The genera *Trioxys* and *Binodoxys*. *Israel Journal of Entomology*, 27: 31-47.

- Mitrovski-Bogdanović, A., Tomanović, Ž., Mitrović, M., Petrović, A., Ivanović, A., Žikić, V., Starý, P., Voburger, C., 2014. The *Praon dorsale* – *yomenae* s.str. complex (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae): Species discrimination using morphometrics and molecular makers with description of a new species. *Zoologischer Anzeiger*, 253: 270-282. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2014.02.001>
- Mitrović, M., Tomanović, Ž., 2018. New internal primers targeting short fragments of the mitochondrial COI region for archival specimens from the subfamily Aphidiinae (Hymenoptera, Braconidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 64: 191-210. <https://doi.org/10.3897/jhr.64.25399>
- Monteiro, L., 1999. Multivariate Regression Models and Geometric Morphometrics: The Search for Causal Factors in the Analysis of Shape. *Systematic Biology*, 48: 192-199.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York, Oxford University Press.
- O'Donnell, D., 1989. A morphological and taxonomic study of first instar larvae of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Systematic Entomology*, 14: 197-219.
- O'Connor, J.P., Nash, R., van Achterberg, C., 1999. A catalogue of the Irish Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). Occasional Publication of the Irish Biogeographical Society. Number 4. 123pp.
- Ortega-Blanco, J., Bennett, D.J., Delclòs, X., Engel, M.S., 2009. A Primitive Aphidiinae Wasp in Albian Amber from Spain and the Northern Hemisphere Origin for the Subfamily (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 82 (4): 273-282. <https://doi.org/10.2317/JKES0812.08.1>
- Parreño, M.A., Ivanović, A., Petrović, A., Žikić, V., Tomanović, Ž., Voburger, C., 2017. Wing shape as a taxonomic trait: Separating genetic variation from host-induced plasticity in aphid parasitoids. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 180: 288-297. <http://doi.org/10.1111/zoj.12490>

- Petrović, A., Mitrović, M., Ghaliow, M.E., Ivanović, A., Kavallieratos, N.G., Starý, P., Tomanović, Ž., 2018. Resolving the taxonomic status of biocontrol agents belonging to the *Aphidius eadyi* species group (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae): an integrative approach. *Bulletin of Entomological Research*, 109: 342-355. <https://doi.org/10.1017/S000748531800055X>
- Petrović-Obradović, O. 2003. *Biljne vaši (Homoptera: Aphididae) Srbije*. Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu, 1-153.
- Pike, K.S. Starý, P., 1995. *Binodoxys conei* sp. n. (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae), a New Parasitoid of Hop Aphid, *Phorodon humuli* (Schrank) in Washington State. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 68: 444-450.
- Pike, K.S., Starý, P., Allison, D., Graf, G., Boydston, L., Miller, T., 1997. Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of aphids on big sagebrush (*Artemisia tridentata* Nuttall) and prairie sage (*Artemisia ludoviciana* Nuttall) in Washington State. *Proceeding of Entomological Society of Washington*, 99: 143-155.
- Pike, K.S., Starý, P., Miller, R., Graf, G., Allison, D., Boydston, L. Miller, T., 2000a. New species and host of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) from the Pacific Northwest, USA. *Proceeding of Entomological Society of Washington*, 98: 570-591.
- Pike, K.S., Starý, P., Miller, T., Graf, G., Allison, D., Boydston, L., Miller, R. 2000b. Aphid parasitoid (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Northwest USA. *Proceeding of Entomological Society of Washington*, 102: 688-740.
- Quicke, D.L.J., van Achterberg. C., 1990. *Phylogeny of the subfamily of the family Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea)*. Nationaal Natuurhistorisch Museum.
- Remaudière, G., Remaudière, M., 1997. *Catalogue of world's Aphididae: Homoptera Aphidoidea*. INRA editions, Paris, 475 pp.
- Rohlf, F.J., 2005. TpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).

- Sanchis, A., Latorre, A., Gonzalés-Candelas, F., Michelena, J.M., 2000. AN 18S rDNA-based molecular phylogeny of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14: 180-194. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0701>
- Schlinger, E.I., 1974. Continental drift, *Notofagus*, and some ecologically associated insects. *Annual Review of Entomology*, 19, 323-343.
- Sharanowski, B., 2009. Hymenopteran molecular phylogenetics: from Apocrita to Braconidae (Ichneumonoidea). University of Kentucky, PhD thesis, pp. 129.
- Sharanowski, B.J., Dowling, A.P.G., Sharkey, M.J., 2011. Molecular phylogenetics of Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea), based on multiple nuclear genes, and implication for classification. *Systematic Entomology*, 36: 549-572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.00580.x>
- Sharkey, M.J., 1993. *Family Braconidae. Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Agricultural Canada, 362-395.
- Sharkey, M.J., Wharton, R.A., 1997. Morphology and terminology. In Wharton, R.A., Marsh, P.M., Sharkey, M.J. (Eds.), *Manual of the New World Genera of the Family Braconidae (Hymenoptera)*, Washington, DC, Special Publication 1, International Society of Hymenopterists, pp. 19–37.
- Shaw, M., Huddelston, T., 1991. *Classification and biology of braconid wasps*. Handbook for identification of British insects 7. pp. 1-126.
- Shaw, S.R., 1997. Subfamily Euphorinae, in: Wharthon, R.A., Marsh, P.M., Sharkey, M.J. (Eds.), *Manual of the New World Genera of the Family Braconidae (Hymenoptera)*, Washington, DC, Special Publication 1, International Society of Hymenopterists, pp. 235-256.
- Shuja-Uddin, 1973. Three species of *Trioxys* Haliday (hymenoptera: Aphidiidae) recorded from India. *Indian Journal of Entomology*, 35: 9-14.
- Smith, C.F., 1944. *The Aphidiinae of North America (Braconidae: Hymenoptera)*. Contributions in Zoology and Entomology, No. 6. The Ohio State University. Columbus. U. S. A. 153 pp.

- Smith, P.T., Kambhampati, S., Volkl, W., Mackauer, M., 1999. A phylogeny of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) inferred from mitochondrial NADH 1 dehydrogenase gene sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11: 236-245. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0575>
- Stanković, S.S., Petrović, A., Ilić Milošević, M., Starý, P., Kavallieratos, N.G., Žikić, V., Tomanović, Ž., 2015. Morphological and molecular characterization of common European species of *Adialytus* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) based on the mtCOI barcoding gene and geometric morphometrics of forewings. *European Journal of Entomology*, 112: 165-174. <https://doi.org/10.14411/eje.2015.007>
- Starý, P., 1966. *Aphid parasites of Czechoslovakia*. W. Junk, The Hague.
- Starý, P., 1970. *Biology of aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) with respect to integrated control*. Vol 6. Dr. W. Junk b.v., The Hague.
- Starý, P., 1976. Two new *Pseudephedrus* Starý, aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) associated with *Nothofagus* in South America. With notes on the continental drift. *Entomologica Scandinavica*, 7: 24-31.
- Starý, P., 1978. Parasitoid spectrum of the arboricolous callaphid aphids in Europe (Hymenoptera, Aphidiidae; Homoptera, Aphidoidea, Callaphidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 75: 164-177.
- Starý, P., 1981a. On the strategy, tactics and trends of host specificity evolution in aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 78: 65-75.
- Starý, P., 1981b. Biosystematical classification of *Trioxys* Haliday and related genera (Hymenoptera, Aphidiidae). *Bollettino-Laboratorio di Entomologia Agraria*, 38: 85-93.
- Starý, P., 1981c. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphidiidae) of Cuba. *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 78: 33-42.
- Starý, P., 1989. *Aphidiidae*. *Acta Faunistica Entomologica Musei Nationalis Pragae*. XIX:45-48.

- Starý, P., 1990. *Trioxys brevicornis*, a new parasitoid and potential biocontrol agent of the asparagus aphid, *Brachycorynella asparagii* (Hymenoptera: Aphidiidae; Homoptera: Aphidoidea). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 87: 87-96.
- Starý, P., 1995. The Aphidiidae of Chile (Hymenoptera, Ichneumonoidea, Aphidiidae). *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 42(1): 113-138.
- Starý, P., 2005. New species and a review of aphid parasitoids of Madagascar (Hym., Braconidae, Aphidiinae). *Linzer Biologische Beitrage*, 37(2): 1711-1718.
- Starý, P., Carver, M., 1971. A new genus and species of Aphidiidae (Hymenoptera) parasitizing *Sensoriaphis* (Hemiptera) on *Nothofagus* in New South Wales. *Australian Journal of Entomology*, 10: 175-178. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.1971.tb00028.x>
- Starý, P., Cermeli, M., 1989. Parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae) de áphidos en plantas cultivadas de Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana*, 5: 77-80.
- Starý, P., Choi, J.Y., 2000. An annotated review of tritrophic associations of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Korea. *Insecta Koreana*, 17: 91-109.
- Starý, P., Delphino, M.A., 1987. Parasitoids (Hym., Aphidiidae) of aphids (Hom., Aphididae) in Tucuman, Argentine. *Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri. Portici*, 43: 41-50.
- Starý, P., Rakhshani, E., Havelka, J., Tomanović, Ž., Kavallieratos, N.G. Sharkey, M., 2010a. Review and Key to the World Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Greenideinae Aphids (Hemiptera: Aphididae), Including Notes on Invasive Pest Species. *Annals of the Entomological Society of America*, 103: 307-321. <https://doi.org/10.1603/AN09127>
- Starý, P., Rakhshani, E., Tomanović, Ž., Kavallieratos, N.G., Sharkey, M., 2010b. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) from Thailand. *Zootaxa*, 2498: 47-52.
- Starý, P., Remaudière, G., 1982. New genera, species, and host records of aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphidiidae) from Mexico. *Annales de la Société Entomologique de France*, 18: 107-127.

- Starý, P., Remaudière, G., van Harten, A., 1977. New *Trioxys* aphid parasites from the Ethiopian region (Hymenoptera: Aphidiidae). *Annales de la Société Entomologique de France*, 13(1): 185-190.
- Starý, P., Schillinger, E.S., 1967. *A revision of the Far East Asian Aphidiidae (Hymenoptera)*. Series Entomologica. W. Junk. The Hague. 204pp.
- StatSoft Inc. 2004. Statistica (data analysis software system), version 7, www.statsoft.com.
- Strelin, M.M., Benitez-Vieyra, S.M., Fornoni, J., Klingenberg, C.P., Cocucci, A.A., 2016. Exploring the ontogenetic scaling hypothesis during the diversification of pollination syndromes in *Caiophora* (Loasaceae, subfam. Loasoideae). *Annals of botany*, 117:937-947.
- Takada, H., 1968. Aphidiidae of Japan (Hymenoptera). *Insecta Matsumurana*, 30: 67-124.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.
- Timm, N.H., 2002. *Applied multivariate analysis*. New York, Springer.
- Tobias, V.I., 1967. A review of the classification, phylogeny and evolution of the family Braconidae (Hymenoptera). *Entomologicheskoe Obozrenie*, 56: 646–659.
- Tobias, V., Kyriak, I., 1971. *Areopraon pilosum* Mackauer 1959, and problems concerning phylogeny and distribution of the family Aphidiidae (Hymenoptera). *Entomologicheskoe Obozrenie*, 50: 11-16.
- Todorov, O., 2009. New records of Aphidiidae (Hymenoptera) from Nepal. *Linzer Biologischer Beitrage*, 41: 885-888.
- Todorov, O.B., 2006. *Boreogalba julianae* sp. nov. (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) from Bulgaria. *Entomofauna*, 27(28): 357-360.
- Tomanović, Ž., Mitrović, M., Petrović, A., Kavallieratos, N.G., Žikić, V., Ivanović, A., Rakhshani, E., Starý, P., Vorburger, C., 2018. Revision of the European *Lysiphlebus* species

- (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) on the basis of COI and 28SD2 molecular markers and morphology. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 76: 179-213.
- Tremblay, E., 1975. Le specie de *Trioxys* Hal. (Hymenoptera Ichneumonoidea) parasite di Afidi del genere *Cavariella* Del Guer. (Homoptera Aphidoidea). *Instituto di Entomologia Agraria dell'Università di Napoli – Portici*, 3-11.
- Tremblay, E., Calvert, D., 1971. Embryosystematics in the aphidiines (Hymenoptera: Braconidae). *Bolletiono del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri di Portici*, 29: 223-249.
- van Achterberg, C., 1997. Aphidiinae. In Wharton, R.A., Marsh, P.M., Sharkey, M.J. (Eds.) *Manual of the New World genera of the family Braconidae (Hymenoptera)*, Washington, DC, Special Publication 1, International Society of Hymenopterists, pp. 119-133.
- van Achterberg, C., 2103. Fauna Europaea: Braconidae. Fauna Europaea version 2017.06, <https://fauna-eu.org> (accessed 30 January 2019).
- van Achterberg, C. Haeselbarth, E., 2003. Revision of the genus *Syntretus* Förester (Hymenoptera: Braconidae: Euphorinae) from Europe. *Zoologische Mededelingen*, 77: 9-78.
- Villegas, C.M., Žikić, V., Stanković, S.S., Ortiz-Martínez, S.O., Peñalver-Cruz, A., Lavandero, B., 2017. Morphological variation of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) associated with different hosts. *PeerJ*, 5:e3559. <https://doi.org/10.7717/peerj.3559>
- Völkl, W., Mackauer, M., 2000. Oviposition behaviour of aphidiine wasps (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae): morphological adaptations and evolutionary trends. *The Canadian Entomologist*, 132: 197-212. <https://doi.org/10.4039/Ent132197-2>
- Wharton, R.A., Shaw, S., Sharkey, M., Wahl, D., Wooley, J., Withfield, J., Marsh, P., Johnson, W., 1992. Phylogeny of the subfamilies of the family Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea): a reassessment. *Cladistics*, 8: 199-235.
- Wharton, R.A., Marsh, P.M., Sharkey, M.J., 1997. *Manual of the New World genera of the family Braconidae*. The International Society of hymenopterists, Washington, District of Columbia.

- Whitfield, J.B., 1998. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 43: 29-151. <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.129>
- Wickham, H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer -Verlag New York.
- Ye, Z., Vollhardt, I.M.G., Tomanovic, Ž., Traugott, M., 2017. Evaluation of three molecular markers for identification of European primary parasitoids of cereal aphids and their hyperparasitoids. *PLoS ONE*, 12, e0177376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177376>
- Yu, D., van Achterberh, C., Horstmann, K., 2012. Taxapad 2012> World Ichneumonoidea, Taxonomy, biology, morphology and distribution. Vancouver, Canada.
- Zalddivar-Rivéron, Shaw, M.R., Sáez, A.G., Mori, M., Belokobylskij, S.A., Shaw, S.R., Quicke, D.L.J., 2008. Evolution of the parasitic wasp subfamily Rogadinae (Braconidae): phylogeny and evolution of lepidopteran host ranges and mummy characteristics. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 329. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-329>
- Zumoffen, L., Salvo, A., Salto, C.E., Manfrino, R.G. Pike, K.S., 2013. First record and redescription of *Binodoxys brevicornis* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) from Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 72: 91-97.
- Žikić, V., 1999. Faunistička i biogeografska studija braconide Sićevačke klisure (Braconidae: Hymenoptera). Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Žikić, V., Ilić Milošević, M., Stanković, S.S., Petrović, A., Petrović-Obradović, O., Kavallieratos, N.G., Starý, P., Tomanović, Ž. 2012. Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) of Serbia and Montenegro: Tritrophic interactions. *Acta entomologica serbica*, 17: 83-105.
- Žikić, V., Petrović, A., Ivanović, A., 2014. Allometric shape changes indicate significant divergence in the wing shape between asexual and sexual lineages of *Lysiphlebus fabarum* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae). *Acta Entomologica Serbica*, 19: 53-62.
- Žikić, V., Lazarević, M., Milošević, D., 2017b. Host range patterning of parasitoid wasps Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Zoologischer Anzeiger*, 268: 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2016.10.001>

Žikić, V., Stanković, S.S., Petrović, A., Ilić Milošević, M., Tomanović, Ž., Klingenberg, C.P., Ivanović, A., 2017a. Evolutionary relationships of wing venation and wing size and shape in Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Organisms Diversity and Evolution*, 17: 607-617. <https://doi.org/10.1007/s13127-017-0338-2>

Izvod

Rod *Biodoxys* grupiše oko 70 vrste pretežno holarktičkog rasprostranjenja. Na osnovu prisustva sekundarnih tuberkula na petiolusa, drugom metazomalnom segmentu, rod *Binodoxys* je odvojen od roda *Trioxys*. Značajni karakteri za identifikaciju vrsta unutar roda *Binodoxys* su položaji primarnih i sekundarnih tuberkula petiolusa. Na osnovu ovih, i drugih morfoloških karakterata, u Evropi je do danas opisano osam vrsta. Cilj ove studije je utvrđivanje molekularnih i morfoloških razlika između šest evropskih vrsta roda *Binodoxys*, kao i pravljenje ključa za identifikaciju vrsta. Morfološke analize (metoda geometrijske morfometrije) obuhvatile su 111 petiolusa i 175 prednjih krila ženki. Genetičke distance između vrsta analizirane su upoređivanjem barkoding sekvence COI gena. Geometrijska analiza petiolusa, ukazala je na postojanje dve morfo-grupe: „*angelicae*“ (*B. angelicae* и *B. centaureae*) i „*acalephae*“ (*B. acalephae*, *B. brevicornis*, *B. heraclei* и *B. similis*). Vrste iz „*angelicae*“ morfo-grupe imaju izdužene petioluse sa velikom distancom između primarnih i sekundarnih tuberkula, dok su petiolusi „*acalephae*“ grupe kratki i sa manjom pomenutom distancom. Međutim, analizom veličine i oblika prednjih krila, utvrđeno je da su krila *B. similis* sličnija krilima „*angelicae*“ morfo-grupe u poređenju sa krilima „*acalephae*“ morfo-grupe. Molekularnom analizom potvrđeno je šest „dobrih“ vrsta, diskriminisanih u dve filogenetske klade. Prvu kladu čine dve vrste, *B. angelicae* i *B. centaureae*, dok su u drugoj filogenetskoj liniji grupisane ostale četiri vrste (*B. acalephae* + (*B. heraclei* + (*B. brevicornis* + *B. similis*))). Mapiranjem filogenije na morfološke podatke, ukarazlo je da filogenetski srodne vrste imaju slične oblike petiolusa, ali ne i krila. Elektronska i svetlosna mikroskopija ukazale su i na značajne razlike u obliku glava i legalica. Vrste „*angelicae*“ filomorogrupe se odlikuju izduženim glavama i petiolusima, ali kratim legalicama, kada se porede sa vrstama „*acalephae*“ grupe. Na osnovu svih analiza, potvrđeno je svih šest vrsta roda *Binodoxys* razdvojenih u dve filo-morfogrupe: „*angelicae*“ и „*acalephae*“.

Summary

The genera *Binodoxys* assembles 70 species of Holarctic distribution. Based on the presence of secondary tubercles on the second metasomal segment (petiole), genera *Binodoxys* can be discriminated from the *Trioxys* species. The position of the primary and secondary tubercles is taxonomic character for the separation of *Binodoxys* species. Based on the morphology of the petiole and other morphological characters, eight species have been described in European fauna. The main objective of this study is to determine the molecular and morphological differences between the six European species. Morphologically, using the geometric morphometrics method, 111 petioles and 175 forewings of females were analysed. Molecular analysis was applied using the barcoding COI gene. The geometric morphometrics method of petioles showed the existence of two morpho-groups: „*angelicae*“ (*B. angelicae* и *B. centaureae*) and „*acalephae*“ (*B. acalephae*, *B. brevicornis*, *B. heraclei* и *B. similis*). Species from the „*angelicae*“ morpho-group have elongated petioles long distance between the primary and secondary tubercles, while the petioles of “*acalephae*” morpho-group are short and with smaller intertubercular distance. The geometric morphometrics of forewings, showed that the *B. similis* has similar wing morphology to that in “*angelicae*” morpho-group. Forewings of “*angelicae*” morpho-group were narrowed, and with longer radial sector vein, when compared to the members of “*acalephae*” group. Molecular analysis confirmed the existence of six species, which are discriminated in two phylogenetic clades. The first clade clusters two species (*B. angelicae* and *B. centaureae*), while the remaining four species are grouped in the second lineage (*B. acalephae* + (*B. heraclei* + (*B. brevicornis* + *B. similis*))). Mapping the phylogeny over the morphological data showed that phylogenetically closer species have a similar petiole shape, but not forewings. Scanning electron microscopy revealed differences in shape and size of the heads and ovipositor. Members of “*angelicae*” phylo-morpho-group have long petioles and heads, but short ovipositors. Based on all the analyses applied, the existence of six *Binodoxys* species classified into two phylo-morpho groups („*angelicae*“ and „*acalephae*“) was confirmed.

BIOGRAFIJA AUTORA

Maja J. Lazarević je rođena u Nišu 29.04.1991. godine. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Nišu. Osnovne akademske studije upisuje na Prirodno-matematičkom fakultetu, na Departmanu za Biologiju i ekologiju 2009. godine. Zvanje biolog stiče 2012. godine, kada završava osnovne akademske studije sa prosečnom ocenom 9,13. Iste godine upisuje master akademske studije smer biologija na Departmanu za Biologiju i Ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu koje završava 2014. godine sa prosečnom ocenom 10,0. Doktorske akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Departmanu za Biologiju i Ekologiju upisala je 2014. godine.

Kao Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja bila je angažovana na projektu pod nazivom: „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena (Evidencioni broj III43001) od 2015-2018. godine, dok je od 2018. godine zapošljena kao istraživač-saradnik na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Nišu.

Član je Entomološkog društva Srbije i biološkog društva „Dr Sava Petrović“.

Govori i piše engleski jezik.

BIBLIOGRAFIJA

A. Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

Lazarević, M., Stanković, S.S., Petrović, A., Ilić Milošević, M., Tomanović, Ž., Ivanović, A., Žikić, V., 2019. Comparativ morphometric analysis of petioles and forewings of the European *Binodoxys* Mackauer species (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Zoologischer Anzeiger*.

B. Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

Lazarević, M., Kavallieratos, N.G., Nika, E.P., Boukouvala, M.C., Skourti, A., Žikić, V., Papanikolaou, N.E., 2019. Does the exposure of parental female adults of the invasive *Trogoderma granarium* Everts to pirimiphos-methyl on concrete affect the morphology of their adult progeny? A geometric morphometrics approach. *Environmental science and Pollution Research*, <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06120-y>

Žikić, V., Lotfalizadeh, H., Schwarz, M., Stanković, S., **Lazarević, M.**, Kos, K., Rakshani, E., Tschorsnig, H-P., 2018. Parasitoids of European species of the genus *Yponomeuta* Latreille 1796 (Lepidoptera: Yponomeutidae): new findings with an updated checklist. *Phytoparasitica*, 46: 617-626. <https://doi.org/10.1007/s12600-018-0703-5>

Žikić, V., **Lazarević, M.**, Milošević, Đ. Host range patterning of parasitoid wasps Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Zoologischer Anzeiger* (2017), 268: 75-83. <http://doi.org/10.1016/j.jcz.2016.10.001>

C. Radovi u nacionalnim časopisima (M53)

Lazarević, M., Ilić Milošević, M., Stanković, S.S., Žikić, V., 2017. Morphological discrimination of the genera *Binodoxys* Mackauer and *Trioxys* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) based on the general shape of forewings. *Biologica Nyssana*, 8: 91-97. <http://doi.org/10.5281/zenodo.200405>

Ilić Milošević, M., **Lazarević, M.**, Petrović-Obradović, O., Žikić, V., 2014. Tritrophic associations of *Lysiphlebus fabarum* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Serbia. *Biologica Nyssana*, 5: 113-121.

Žikić, V., **Lazarević, M.**, Stanković, S.S., Ilić Milošević, M., 2015. New data on Microgastrinae in Serbia and Montenegro (Hymenoptera: Braconidae) and their hosts. *Biologica Nyssana*, 6: 41-48.

Žikić, V., Ilić Milošević, M., **Lazarević, M.**, Stanković, S.S., 2016. Plants and insects in interactions: multitrophic associations. *Biologica Nyssana*, 7: 75-82.
<http://doi.org/0.5281/zenodo.200402>

D. Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

Raca, I., **Lazarević, M.**, Žikić, V., Nikolić, D., Harpke, D., Randelović, V. Geometric morphometrics of perigone segments shape in different species from series Verni Mathew (*Crocus* L. Iridaceae). 7th Balkan Botanical Congress, 10-14. 09. 2018. Novi Sad, Serbia.

Durđević, A., Žikić, V., Savić Zdravković, D., **Lazarević, M.**, Milošević, Dj. Can we guess autecology following the variability of mandible shape in the Chironomidae family? 20th International Symposium on Chironomidae, 02-08.07.2017., Trento, Italy. Book of abstracts. P110.

Žikić, V., **Lazarević, M.**, Milošević, D. New aspect of host range patterning of Aphidiinae parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). XIII International Symposium of Ecology of Aphidophaga 28.08-02.09.2016, Friesing, Germany. Book of abstracts.

Lazarević, M., Ilić Milošević, M., Stanković, S.S., Žikić, V. Comparative morphology of forewings of the genera *Trioxys* Haliday and *Binodoxys* Mackauer (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). XII Symposium on the Flora of the Southeastern Serbia and the Neighbouring Regions, 16-19.06.2016, Kopaonik mt. Serbia. Book of abstracts. P147

Žikić, V., Ilić Milošević, M., **Lazarević, M.**, Stanković, S. Plants and insects in multitrophic associations. XII Symposium on the Flora of the Southeastern Serbia and the Neighbouring Regions, 16-19.06.2016, Kopaonik mt. Serbia. Book of abstracts. P8

E. Saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu
(M64)

- Lazarević, M.**, Stanković, S.S., Ilić Milošević, M., Žikić, V. Sezonski polimorfizam krila vrste *Cotesia ofella* (Nixon) (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae). XII Simpozijum Entomologa Srbije, 25-29.09.2019. Niš, Serbia. Book of abstracts. PP15.
- Žikić, V., Stanković, S.S., **Lazarević, M.**, Ilić Milošević, M., Mitrović, M. Filogenetski odnosi unutar *Cotesia „tibialis“* grupe (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae). XII Simpozijum Entomologa Srbije, 25-29.09.2019. Niš, Serbia. Book of abstracts. P17.
- Lazarević, M.**, Stanković, S.S., Ilić Milošević, M., Žikić, V., Tomanović, Ž. 2017. Uporedna analiza prednjih krila i petiolusa evropskih vrsta roda *Binodoxys* Mackauer. XI Simpozijum Entomologa Srbije, 17-21.09.2017, Goč, Serbia. Book of abstracts. P37-38pp.
- Žikić, V., Stanković, S.S., **Lazarević, M.**, Ilić Milošević, M. 2017. Morfološke karakteristike kokona u funkciji identifikacije blisko srodnih vrsta podfamilije Microgastrinae (Hymenoptera: Braconidae). XI Simpozijum Entomologa Srbije, 17-21.09.2017, Goč, Serbia. Book of abstracts. P35.
- Ilić Milošević, M., Ristić, M., Stanković, S.S., **Lazarević, M.**, Žikić, V. 2017. Primena geometrijske morfometrije na oblik i nervaturu krila izabranih vrsta biljnih vaši (Hemiptera: Aphididae). XI Simpozijum Entomologa Srbije, 17-21.09.2017, Goč, Serbia. Book of abstracts. P41-42.
- Stanković, S.S., Žikić, V., Ilić Milošević, M., **Lazarević, M.**, Tchorsnig, H.P. 2017. Muve guseničarke (Diptera: Tachinidae) u Srbiji i Crnoj Gori, ček-lista i novi nalazi. XI Simpozijum Entomologa Srbije, 17-21.09.2017, Goč, Serbia. Book of abstracts. P76-77.
- Žikić, V., Stanković, S.S., Ilić Milošević, M., **Lazarević, M.** 2015. Novi podaci o fauni Microgastrina (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae) na teritoriji Srbije i Crne Gore. X Simpozijum Entomologa Srbije, 23-27.09.2015, Kladovo, Serbia. Book of abstracts. P24.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

МОЛЕКУЛАРНА И МОРФОЛОШКА КАРКТЕРИЗАЦИЈА ЕВРОПСКИХ ВРСТА РОДА *VINODOXYS* MASCKAUER (HYMENOPTERA: BRACONIDAE: APHIDINAE)

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 16.10.2019

Потпис аутора дисертације:


Маја Ј. Лазаревић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**МОЛЕКУЛАРНА И МОРФОЛОШКА КАРКТЕРИЗАЦИЈА ЕВРОПСКИХ ВРСТА
РОДА *VINODOXYS* MACKAUER (HYMENOPTERA: BRACONIDAE: ARHIDIINAE)**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 16.10.2015

Потпис аутора дисертације:


Маја Ј. Лазаревић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

МОЛЕКУЛАРНА И МОРФОЛОШКА КАРКТЕРИЗАЦИЈА ЕВРОПСКИХ ВРСТА РОДА *VINODOXYS* MASKAUER (HYMENOPTERA: BRACONIDAE: APHIDIDINAE)

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 16. 10. 2019

Потпис аутора дисертације:


Маја Ј. Лазаревић