

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marijana M. Ilić Milošević

**TAKSONOMSKI STATUS RODOVA I
VRSTA *EUAPHIDIUS* MACKAUER I
REMAUDIAREA STARÝ
(HYMENOPTERA, BRACONIDAE,
APHIDIINAE) NA OSNOVU
MORFOLOŠKIH I MOLEKULARNIH
ANALIZA 28S rRNK I COI GENA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marijana M. Ilić Milošević

**TAXONOMIC STATUS OF GENERA AND
SPECIES OF *EUAPHIDIUS* MACKAUER
AND *REMAUDIAREA* STARÝ
(HYMENOPTERA, BRACONIDAE,
APHIDIINAE) BASED ON
MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR
ANALYSES OF 28S rRNA AND COI
GENES**

doctoral dissertation

Belgrade, 2015

Mentor:

Dr Vladimir Žikić, vanredni profesor

Univerzitet u Nišu,

Prirodno-matematički fakultet, Departman za
biologiju i ekologiju

Mentor:

Dr Željko Tomanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu,

Biološki fakultet

Član komisije:

Dr Anđeljko Petrović, docent

Univerzitet u Beogradu,

Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Izrada doktorske disertacije je dug i kompleksan proces. Srećom, taj proces je uz snažnu i iskrenu podršku uspešno okončan zahvaljujući mom istraživačkom timu, kolegama, prijateljima i porodici kojima ovom prilikom želim da se zahvalim:

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Vladimiru Žikiću, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu na velikom i iskrenom angažovanju u svakoj fazi izrade ove disertacije. Dr Vladimir Žikić me je uveo u neverovatan svet parazitskih osa, i pri tome imao strpljenja i odgovore na sva moja pitanja.

Zahvaljujem se i mentoru dr Željku Tomanoviću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na znanju koje mi je pružio iz oblasti biologije i ekologije parazitskih osa. Hvala na razumevanju i na uvek izdvojenom vremenu za razrešenje raznih nedoumica, kao i na savetima pri pisanju disertacije.

Veliko hvala i dr Anđeljku Petroviću, docentu Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pre svega na prilici da ovladam tehnikama rada u PCR laboratoriji, kao i na pomoći koju mi je pružio iz oblasti molekularne sistematike. Hvala i na korisnim sugestijama prilikom izrade disertacije.

Dr Ani Ivanović, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i dr Milani Mitrović, naučnom saradniku Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu dugujem zahvalnost na velikoj pomoći u vezi sa geometrijskom morfometrijom i molekularnim analizama.

Zahvaljujem se dr Oliveri Petrović-Obradović, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na pomoći pri identifikaciji biljnih vaši.

Kolegama dr Saši Stankoviću veliko hvala za pomoć u eksperimentalnoj fazi istraživanja i Jelisaveti Črkić na pomoći u laboratoriji.

Prijatelju i kolegini Jeleni Rajković na podršci tokom zajedničkog školovanja i na pomoći u vezi sa skening elektronskom mikroskopijom.

Sledećim kolegama dugujem zahvalnost na materijalu koji su mi ustupili: dr Petr Starý, Institute of Entomology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, dr Ehsan Rakhshani, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Zabol, Iran i dr. Christoph Vorburger, Institute of Integrative Biology, Switzerland

Hvala kolegama i prijateljima sa Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu na konkretnoj pomoći, razumevanju i interesovanju.

Suprugu i kolegi Đurađu Miloševiću hvala na strpljenju i razmevanju, kao i na stručnoj pomoći pri pisanju disertacije. Hvala porodici na podršci pri savladavanju svake stepenice u mom školovanju i podstreku.

Ovaj doktorat posvećujem mami, baba Dudi i mom Milutinu. Veliko vam hvala.

Autor

**Taksonomski status rodova i vrsta *Euaphidius* Mackauer i *Remaudierea* Starý
(Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) na osnovu morfoloških i molekularnih analiza
28S rRNK i COI gena**

Rezime

Taksonomski status roda *Euaphidius* Mackauer, sa dve opisane vrste *E. cingulatus* (Ruthe) i *E. setiger* Mackauer, je poslednjih decenija pod znakom pitanja. Ove dve vrste su u literaturi obično razmatrane u okviru roda *Aphidius* Nees. Međutim, na osnovu nekih morfoloških karakteristika, pre svega, tentorijalnog indeksa kao i njihove biologije, Mackauer (1961) ih je izdvojio u poseban rod, *Euaphidius*. Rod *Remaudierea* Starý, sa jednom opisanom vrstom *R. plocamaphidis* Starý je sličan vrstama roda *Aphidius* i *Euaphidius*, pre svega po nervaturi krila i obliku petiolusa. Morfološka i genetička varijabilnost tri parazitske ose *E. cingulatus*, *E. setiger* i *R. plocamaphidis*, kao i njihov taksonomski položaj u odnosu na vrste roda *Aphidius*, su analizirani metodama „tradicionalne“ i geometrijske morfometrije, kao i analizom sekvenci mitohondrijalnog gena za citohrom oksidazu I (mt COI) i varijabilnog D2 regiona gena za veliku ribozomalnu subjedinicu 28S (28S rRNK). „Tradicionalnom“ morfometrijom utvrđeni su karakteri koji su pokazali najveću varijabilnost u morfologiji između analiziranih vrsta. To su pokazali karakteri odnos dužine pterostigme i dužine R1 nerva, broj rinarija na prvom flagelarnom članku, kao i broj dlačica u gornjoj areoli propodeuma. Analizom oblika prednjih krila uz primenu geometrijske morfometrije uočeno je da vrste roda *Euaphidius* imaju kraći R1 nerv i šira krila u centralnom delu u odnosu na vrste roda *Aphidius*. Takođe, vrsta *E. cingulatus* se razlikuje od vrste *E. setiger* užim krilom u centralnom delu i dužim distalnim delom prednjeg krila. Molekularnom analizom na osnovu mtCOI i 28S rRNK gena su utvrđene male razlike između rodova *Euaphidius* i *Remaudierea*, kao i izabranih vrsta roda *Aphidius*. Kombinacija sve tri primenjene metode nije potvrdila status roda *Eupahidius*. Sve analizirane vrste (*E. cingulatus*, *E. setiger* i *R. plocamaphidis*) su premeštene u rod *Aphidius*, s tim što se vrste *E. cingulatus* i *R. plocamaphidis* izdvajaju u okviru podroda *Euaphidius*, a *E. setiger* u podrod *Aphidius*.

Ključne reči: *Aphidius*, *Euaphidius*, *Remaudierea*, parazitoidi, taksonomija, geometrijska morfometrija, mtCOI gen, 28SD2 rRNK gen

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Morfologija, sistematika i filogenija životinja

UDK broj: [595.79:591.557.8]:[57.063.6:575.86](043.3)

Taxonomic status of genera and species of *Euaphidius* Mackauer and *Remaudierea* Starý (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) based on morphological and molecular analyses of 28S rRNA and COI genes

Summary

Taxonomic status of the genus *Euaphidius* Mackauer with two described species *E. cingulatus* (Ruthe) and *E. setiger* Mackauer has been questionable over past few decades. In the literature, these two species are considered within the genus *Aphidius*. However, based on some morphological characteristics, such as tentorial index, also biology of analysed species, Mackauer (1961) raised them into the separate genus, *Euaphidius*. The genus *Remaudierea* Starý, which was described by the only known species *R. plocamaphidis* Starý, resembles *Aphidius* and *Euaphidius* species, primarily by the wing venation pattern and the shape of a petiole. Morphological and genetic variability of the species *E. cingulatus*, *E. setiger* and *R. plocamaphidis*, and their taxonomic position in relation to the *Aphidius* species, were analysed using traditional and geometric morphometrics, as well as using molecular analysis of cytochrome oxidase 1 (mtCOI) and the variable D2 region of the ribosomal gene 28S (28S rRNA). Using traditional morphometrics method, characters that showed the greatest variability in morphology among analysed species were identified. The significant variability was detected over ratio values: the length of pterostigma and the length of R1 vein, the number of olfactory grooves (rhinaria) on the first segment of antenna and the number of setae in the upper lateral areola of the propodeum. Analysis of the forewing shape using geometric morphometrics showed that the species from the genus *Euaphidius* have shorter R1 vein and wider wings in medial part than in species from *Aphidius*. Likewise, the species *E. cingulatus* is discriminated from *E. setiger* by a narrower forewings in the central part and generally, they wings are longer in the distal part. On the basis of molecular analysis of the mtCOI and 28S rRNA genes, small genetic differences among genera *Euaphidius* and *Remaudierea*, and selected *Aphidius* species were determined. The combination of three applied methods was not confirmed the status of genus *Euaphidius*. We have changed the status of *E. cingulatus*, *E. setiger* and *R. plocamaphidis* including them in the genus *Aphidius*. The species *E. cingulatus* and *R. plocamaphidis* are joined in the subgenus *Euaphidius*, while *E. setiger* is transferred in the subgenus *Aphidius*.

Key words: *Aphidius*, *Euaphidius*, *Remaudierea*, parasitoids, taxonomy, geometric morphometrics, mtCOI gene, 28SD2 rRNK gene

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Morphology, systematics and phylogeny of animals

UDK number: [595.79:591.557.8]:[57.063.6:575.86](043.3)

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
1.1. Opšte karakteristike članova potfamilije Aphidiinae	1
1.2. Životni ciklus afidiina.....	3
1.3. Selekcija domaćina	5
1.4. Specifičnost prema domaćinima.....	6
1.5. Ekonomski značaj afidiina i biološka kontrola	8
1.6. „Tradicionalna“ i geometrijska morfometrija u istraživanjima afidiina.....	10
1.7. Klasifikacija i filogenetski odnosi unutar potfamilije Aphidiinae.....	12
1.8. Rodovi <i>Aphidius</i> , <i>Euaphidius</i> i <i>Remaudierea</i>	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. „Tradicionalna“ morfometrija	20
3.2. Geometrijska morfometrija.....	24
3.3. Molekularne analize	26
3.3.1. Ekstrakcija DNK	26
3.3.2. Amplifikacija, prečišćavanje i sekvenciranje DNK	28
3.3.3. Filogenetske analize	29
4. REZULTATI	30
4.1. Skening elektronska mikroskopija	30
4.2. Pregled varijabilnosti morfoloških karaktera	31
4.3. Analiza oblika krila primenom geometrijske morfometrije	44
4.4. DNK analize	47
4.4.1. Analiza sekvence mitohondrijalnog COI gena i filogenetska rekonstrukcija	49
4.4.2. Analiza sekvence nuklearnog 28SD2 gena i filogenetska rekonstrukcija....	52
5. DISKUSIJA	55
6. ZAKLJUČCI	61
7. LITERATURA	63

1. UVOD

1.1. Opšte karakteristike članova potfamilije Aphidiinae

Potfamilija Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) obuhvata solitarne, visoko specijalizovane endoparazitoide biljnih vaši (Hemiptera: Aphididae) (Mackauer & Starý, 1967). Do danas je opisano oko 400 do 420 validnih vrsta afidiina, mada se u bazi podataka Taxapad (Yu et al., 2013) nalazi čak 500 vrsta za koje nema sinonima. Afidiine su klasifikovane u oko 40 rodova (Achterberg, 2013). Najveći broj vrsta naseljava severnu zemljinu hemisferu Holarktiku i Orijentalnu oblast (Starý, 1988a; Dolphine & Quicke, 2001). Oko 200 vrsta opisano je u fauni Evrope, dok su 122 vrste registrovane na teritoriji Srbije i Crne Gore (Žikić et al., 2012).

Veličina tela afidiina se kreće od jednog do nekoliko milimetara. Telo je slabo sklerotizovano. Morfološka i anatomska građa je tipično brakonoidna (Shaw & Huddleston, 1991). Glava je poprečna do subkvadratna i ima ortognatan položaj. Na glavi se nalaze par krupnih složenih očiju, tri ocele i končaste antene. Antene se sastoje od osnovnog članka ili skapusa (*scapus*), pedicela ili drške (*pedicel*) i biča (*flagellum*) koji se sastoji od većeg broja članaka, flagelomera. Broj članaka varira od vrste do vrste i kreće se od 8 (ženke vrste *Lysiphlebus balcanicus* Starý) do preko 30 flagelomera kod nekih vrsta roda *Pauesia* Quilis Perez. Mužjaci uglavnom imaju veći broj antenalnih članaka, npr. ženke vrste *Aphidius colemani* Viereck imaju do 16 članaka u antenama, dok mužjaci do 18. Jedino kod roda *Ephedrus* Haliday oba pola imaju isti broj članaka u antenama. Na antenalnim člancima se nalaze rinarije, odnosno mirisne brazde, koje predstavljaju važan taksonomski karakter. Takođe, antene su manje-više dlakave. Na gornjoj usni (clypeus), koja je ispupčena, nalaze se dlačice čiji se broj kreće od nekoliko do preko 20. Na osnovu položaja i broja dlačica može se utvrditi taksonomski status pojedinih rodova. Sa strane klipeusa nalaze se tentorijalne jame. Odnos rastojanja između tentorijalne jame i donje ivice oka i rastojanja između tentorijalnih jama predstavlja tzv. tentorijalni indeks, tj. karakter koji se ponekad koristi u taksonomskim radovima (Tomanović et al., 2007; Rakhshani et al., 2008), iako je još Punglerl (1983) pokazala da taj karakter nije baš pouzdan u svim slučajevima. Isti slučaj je i sa malarnim prostorom koji predstavlja rastojanje između donje ivice oka i ivice

mandibula. Usni aparat je prilagođen za grickanje i srkanje sa dvozubim mandibulama. Broj članaka labijalnih i maksilarnih palpusa usnog aparata varira u zavisnosti od vrste.

Toraks (mezozoma) se sastoji od protoraksa, mezotoraksa i metatoraksa. Svaki segment toraksa se sastoji od notuma, sklerita i pleura. Pronotum je gladak, ponekad i skulpturiran. Mezonotum je najčešće gladak ili granulisan, sa dlakama. Mezoskutum je gladak ili ima brazde i/ili jamicu (*fovea*). U sastav grudnog dela ulazi i prvi abdominalni segment, odnosno propodeum. Suturama je izdijeljen na površine (*alveolae*) različite veličine i oblika i na njemu se nalaze dlake. Propodeum je jedan od najznačajnijih taksonomskih karaktera (Starý, 1973). Na toraksu se najčešće nalazi dva para krila. Postoje i vrste koje su brahipterne ili pak krila uopšte ne postoje (apternost), kao što je vrsta *Trioxys apterus* Gärdenfors (Gärdenfors, 1990). U okviru potfamilije je izražena tendencija redukcije krilne nervature, izuzev kod vrsta rodova *Ephedrus*, *Parephedrus*, i *Toxares* koje su zadržale brakonoidni izgled (eg. Shaw & Huddleston, 1991; Achterberg, 1993). Vrste nekoliko rodova (npr. *Adialytus*, *Binodoxys*, *Trioxys*) imaju skoro potpuno redukovanu nervaturu (Starý, 1975; Tomanović & Kavallieratos, 2002).

Noge su dobro razvijene (relativno duge i tanke) i imaju važnu ulogu pri parazitiranju domaćina. Abdomen (metazoma) je kod ženki izdužen, lancetast, dok je kod mužjaka valjkast. Prvi segment metazome je petiolus, koji je manje ili više izdužen. Ono po čemu se sve vrste ove potfamilije morfološki razlikuju od ostalih brakonida je prisustvo fleksibilne suture između drugog i trećeg tergita metazome i ovaj karakter predstavlja apomorfiju (Starý, 1970; Shaw & Huddleston, 1991; Sharkey, 1993). Svi ostali segmenti metazome su međusobno povezani membranama. Na kraju abdomena se kod ženki nalazi legalica (*ovipositor*) koja je građena od delova osmog i devetog abdominalnog segmenta i čine je kvadratna ploča, valifera I i II, prvi, drugi i treći par valvi. Svi ovi delovi su iste građe kod svih rodova, izuzev trećeg para valvi, koje predstavljaju važan taksonomski karakter za identifikaciju na nivou rodova i vrsta. Muške genitalije su građene od nastavaka devetog abdominalnog segmenta i *aedeagus*-a.

1.2. Životni ciklus afidiina

Aphidiinae pripadaju grupi koinobionata, što znači da nakon parazitiranja domaćin nastavlja da se nesmetano razvija sve do završetka razvojnog ciklusa samog parazitoidea koji se nalazi u telu vaši. Iako parazitiraju sve razvojne stadijume osim jajeta, parazitoidei najčešće biraju drugi i treći larveni stupanj vaši (Shaw & Huddleston, 1991). Neke vrste polažu jaja samo u određeni nimfalni stupanj ili formu za ovipoziciju. Npr. ženka *Dyscritulus planiceps* (Marshall) parazitira samo krilate adulte vrsta roda *Drepanosiphum* (Völkl & Mackauer, 1996). *Monoctonus paulensis* (Ashmead) bira relativno manje biljne vaši u koloniji (Chau & Mackauer, 2000).

Parazitoidei napadaju vaši isturanjem abdomena ispod grudi i glave, pri čemu se on isteže i ženka polaže jaje u telo domaćina. Vreme ovipozicije je različito u zavisnosti od vrste parazitoidea i može biti manje od jedne sekunde (*Diaeretus leucopterus* (Haliday) i *Falciconus pseudoplatani* (Marshall)) (Völkl & Mackauer, 2000) ili do nekoliko minuta (*Monoctonus paulensis*) (Michaud & Mackauer 1995; Chau & Mackauer, 1999). Jaja polažu na bilo kom mestu na telu, izuzev nekih vrsta roda *Monoctonus*, *M. paulensis*, *M. paludum* Marshall i *M. crepidis* (Haliday), koje polažu jaja u torakalnu gangliju između prvog i drugog para nogu, što uzrokuje kratkotrajnu paralizu (Griffiths, 1961; Calvert & van den Bosch, 1972). Na ovaj način su jaja zaštićena od imunog sistema domaćina, tačnije od cirkulatornih hemocita (Griffiths, 1961).

Ženka po pravilu polaže samo jedno jaje u telo domaćina, mada se može desiti da položi dva ili više jaja (superparazitizam). Usled kompeticije, uvek se razvije samo jedna larva, i to obično ona starija. Poliembrionija kod afidiina nije zabeležena, za razliku od mnogobrojnih vrsta iz sestrinskih potfamilija Microgastrinae i Macrocentrinae (Shaw & Huddleston, 1991). U ranom periodu razvića larve, oko njenog kaudalnog dela se stvara visokokalorično tkivo trofamnion koje joj služi za ishranu. Trofamnion postoji tokom prvog larvenog stupnja kada larve parazitoidea poseduju mandibule. Nakon toga, trofamnion se rastavlja na slobodne ćelije teratocite u hemolimfi vaši. Teratocite upijaju hranljive materije iz hemolimfe domaćina kojima se larva parazitoidea hrani do poslednjeg larvenog stupnja (Hinton, 1954). Teratocite imaju važnu ulogu u supresiji imunog sistema vaši (Beckage & Gelman, 2004). Larva II

stupnja ne poseduje mandibule i ona usisava teratocite ezofagusom (Schlinger & Hall, 1960). S obzirom da teratocite upijaju hranljive materije, one izazivaju i degeneraciju embriona u polnim kanalima domaćina, kojima parazitoid takođe počinje da se hrani. Osim toga, neke larve (npr. vrsta *Aphidius ervi* Haliday koja parazitira vaš *Acyrtosiphon pisum*) koriste otrove kojima uništavaju gornje delove domaćinovih jajnika i na taj način dolazi do degeneracije germinativnog sloja jajnika i mladih embriona (Digilio et al., 2000; Falabella et al., 2000). Poslednji larveni stupanj ponovo dobija mandibule i od tog trenutka počinje da se hrani tkivima biljne vaši što dovodi do njenog uginuća. Parazitoidna larva „mumificira“ biljnu vaš, tako što sekretima pljuvačnih žlezda oblaže hitinsku kutikulu vaši iznutra, a samu mumiju prilepljuje za biljku. Larve ispredaju kokone unutar vaši (najveći broj vrsta) ili ispod prazne kutikule (neke vrste tribusa Praini). Kutikula uginule vaši počinje da menja boju (braon, crna, žućkasta) i osobena je za mnoge rodove afidiina (Kavallieratos et al., 2004; Hoy & Singh, 2007). Npr., kod vrsta roda *Aphidius* Nees boja mumije varira od žućkastobele do braonkaste, dok vrste roda *Ephedrus* imaju crne mumije. Nakon metamorfoze, adult iseca mandibulama kružni otvor na zadnjem kraju mumije, gura poklopac i izlazi napolje.

U zavisnosti od uslova spoljašnje sredine, adulti polno sazrevaju odmah nakon izleganja ili nakon nekoliko sati, pri čemu mužjaci obično sazrevaju nešto ranije u odnosu na ženke. Ženke se pare samo jednom ili se uopšte ne pare. Iz neoplođenih, haploidnih jaja razvijaju se samo mužjaci, a iz oplodjenih ženke. Mužjaci se mogu pariti više puta (Hågvar & Hofsvang, 1991). Ceo razvojni ciklus traje od dve do tri nedelje i prvenstveno zavisi od temperature spoljašnje sredine. Većina afidiina ima više generacija tokom jedne godine ukoliko su sredinski uslovi pogodni. Adulti se hrane nektarom, polenom i mednom rosom.

Da bi sinhronizovali životni ciklus sa domaćinima, parazitoidi mogu da uđu u dijapauzu i na taj način prezime ili odlože svoju aktivnost. Parazitoidi koji imaju samo jednu generaciju godišnje ulaze u obligatnu, genetički determinisanu pauzu, dok na one koji imaju više generacija godišnje utiču abiotički (temperatura, fotoperiod) i biotički faktori (nizak nivo dostupnosti domaćina, hormonalno stanje domaćina ili promene u fiziologiji biljka-domaćin) da bi ušli u dijapauzu (Polgár & Hardie, 2000). Većina vrsta roda *Aphidius* ulazi u dijapauzu kada su temperature niske ili dani kratki (Langer &

Hance, 2000). Kod vrsta *Aphidius matricariae* Haliday i *Praon volucre* (Haliday), koje parazitiraju vaš *Aphis fabae*, dijapauza ne zavisi od sredinskih uslova, već nju može da izazove visok nivo egdizonsteroidnih hormona domaćina (Polgár et al., 1991). Takođe, i biljke domaćini mogu da indukuju dijapauzu. One imaju značajnu ulogu u polimorfizmu biljnih vaši. Loša kondicija samih biljaka istovremeno produžava vreme razvića i biljnih vaši i njihovih parazitoida (Polgár & Hardie, 2000). Populacija domaćina u opadanju može da indukuje dijapauzu kod parazitoida. Na primer, vrsta *Aphidius rhopalosiphi* de Stefani-Perez ulazi u dijapauzu u leto kada se populacije vaši na žitaricama znatno smanjuju (Krespi et al., 1997). Kod mnogih vrsta afidiina dijapauza je povezana sa migracijom domaćina na sekundarne biljke hraniteljke ili u drugi tip staništa. Vrsta *Ephedrus persicae* Froggatt koja parazitira vaš *Dysaphis plantaginea*, ulazi u dijapauzu u proleće, pre nego što domaćin u potpunosti napusti jabuku kao primarnu biljku hraniteljku (Starý, 1975).

Aphidiinae umerenih regiona prezimljavaju najčešće kao prepupe ili kao zrele larve. Izuzetak je vrsta *Paralipsis enervis* (Nees) koja živi u gnezdima mrava i koja ulazi u dijapauzu kao adult.

1.3. Selekcija domaćina

Po ekloziji, ženke koje su partenogenetske odmah kreću u potragu za domaćinom, dok se kod seksualnih vrsta ovipoziciona aktivnost ženki odlaže do parenja. Na uspešno pronalaženje domaćina značajnu ulogu igraju i abiotički i biotički faktori. Od abiotičkih faktora to su različiti fizički i hemijski stimuli, a od biotičkih kondiciono stanje samog domaćina, npr., njegovo fiziološko stanje, genotipska struktura, da li je već parazitiran i dr. Pri odabiru domaćina za polaganje jaja, ženka pravi selekciju koja bi se mogla opisati kroz pet faza (Hågvar & Hofsvang, 1991):

1. pronalaženje staništa domaćina
2. pronalaženje potencijalnog domaćina
3. prihvatanje domaćina
4. podesnost domaćina
5. regulacija domaćina.

U prve dve faze, parazitoide koriste signale kao što su elektromagnetno zračenje, zvuk ili miris. Mirisi su vrlo bitni, a to mogu biti isparenja biljaka, mirisi biljke hraniteljke izmenjeni pod uticajem vaši, mirisi domaćina (kairomoni), mirisi drugih organizama koji su u asocijaciji sa domaćinom ili kombinacija svega navedenog (Vinson, 1976, 1984). Neke vrste afidiina (one koje napadaju polifagne vaši) ne reaguju na mirise biljaka. Jedna od takvih vrsta je *Aphidius nigripes* Ashmead (Bouchard & Cloutier, 1985). Među parazitoidima koji preferiraju određenu vrstu vaši, primećeno je da se pri selekciji domaćina prvenstveno oslanjaju na signale koje šalju biljke hraniteljke, pa tek na signale samih potencijalnih domaćina koji proizvode kairomone. Ovakvo ponašanje je zabeleženo kod *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) koja parazitira vaš *Brevicoryne brassicae*.

Kada ženka pronađe potencijalnog domaćina, počinje da ga ispituje antenama, a kasnije i legalicom i tada donosi odluku o prihvatanju ili odbacivanju domaćina (3. faza), na šta utiče više faktora, kao što su: starost, odbrambeni mehanizmi, potencijalna parazitiranost domaćina, itd. Biljne vaši su razvile različite odbrambene mehanizme: bežanje, padanje sa biljke, udarci nogama, izlučivanje voštanih materija iz kornikula kojima upozoravaju ostale biljne vaši u blizini ili pak slepljuju važne organe napadača (Strong, 1967; Edwards et al., 1973; Goff & Nault, 1974).

Kada ženka položi jaje u domaćina, dalji razvoj zavisi od podesnosti domaćina (faza 4), odnosno od komponenata imunog sistema domaćina (Carton et al., 2008), od prisutnih simbionata (Oliver et al., 2003; Vorburger et al., 2009), super ili multiparazitizma, endokrinog statusa domaćina, i sl.

Završna faza (regulacija domaćina) predstavlja mogućnost parazitoide da preživi unutar domaćina, regulišući njegove osnovne životne funkcije.

1.4. Specifičnost prema domaćinima

Na osnovu dosadašnjih istraživanja biljnih vaši ustanovljeno je da za svega nekoliko vrsta nisu utvrđeni prirodni neprijatelji među afidiinama (Mackauer & Starý, 1967). U zavisnosti od same biologije parazitoide, oni pokazuju različit stepen specifičnosti prema domaćinima; od monofagnih koje parazitiraju samo jednog domaćina, preko oligofagnih koje parazitiraju blisko srodne vrste biljnih vaši (Mackauer

et al., 1996), do polifagnih koje parazitiraju preko stotinu različitih vrsta, npr. *Lysiphlebus fabarum* (Marshall), *L. testaceipes* (Cresson), *Aphidius ervi*, *Ephedrus persicae* ili *E. plagiator* (Nees)) koje parazitiraju preko 100 vrsta afidnih domaćina (Gärdenfors, 1986). Prvu podelu parazitoida na osnovu specifičnosti prema domaćinima izneo je Starý (1981) definišući ih u pet tipova:

1. ograničenost na samo jednu vrstu domaćina
2. ograničenost na dve ili više vrsta domaćina u okviru istog roda domaćina
3. ograničenost na dva ili više rodova iste potfamilije
4. ograničenost na dva ili više rodova iz više potfamilija iste familije
5. parazitiranje vaši iz nekoliko rodova iz dve ili više familija

U međuvremenu su familije biljnih vaši dobile status potfamilija (Petrović-Obradović, 2003).

Kao što je prethodno izneto, oni parazitoidi koji su ograničeni na parazitiranje samo jedne vrste, okarakterisani su kao striktno monofagni. Oni koji parazitiraju više vrsta, kao grupe 2, 3 i 4 (po podeli koju je dao Starý (1981), radi se o različitom stepenu oligofagije, a peta grupa parazitoida bi predstavljala polifagne vrste). Striktna monofagija je karakteristična za filogenetski mlađe rodove i vrste (npr. *Pauesia*, mnoge vrste iz rodova *Aphidius* i *Lysiphlebus* i dr.) koje parazitiraju vaši iz takođe, filogenetski mlađih potfamilija Callaphidinae, Chaitophorinae, Aphidinae i Lachninae. Kod filogenetski starijih potfamilija biljnih vaši, odnosno kod Hormaphidinae, Anoecinae, Mindarinae, Pemphiginae ili Thelaxinae, javlja se oligo- ili polifagija kao odgovor parazitoida. Iako ne postoji pravilo koje se tiče vrsta u okviru istog roda parazitoida u domenu specifičnosti prema domaćinima, kod afidiina je uočljiv evolucionni trend koji se kreće od izrazite polifagije ka oligofagiji (Starý, 1981, 1988b) što je primećeno u svim tribusima afidiina. Svakako, treba biti obazriv kada se iznose ovakvi zaključci, jer u obzir treba uzeti i geografsko rasprostranjenje vaši i parazitoida, filogenetske veze oba člana trofičkih asocijacija, samu morfologiju, anatomiju i embriologiju parazitoida. Najbolji primer za odstupanje od bilo kakvog definisanog obrasca su parazitoidi koji su vezani za vaši iz filogenetski najmlađe i najveće grupe Aphidinae, čije članove parazitiraju parazitoidi iz svih pet tipova. Mackauer (1965) ukazuje da domaćini u velikoj meri oblikuju parazitoide, ali ne i isključivo. Naime, na osnovu opsega

domaćina on ističe postojanje paralelne evolucije i koevolucije između biljnih vaši i njihovih parazitoida. S druge strane, mišljenje koje iznosi Starý (1970) je da paralelna evolucija nije jedino objašnjenje u procesu evolucione interakcije biljnih vaši i njihovih parazitoida, odnosno da odgovori članova trofičke asocijacije parazitoid/domaćin na promene životne sredine mogu, ali ne moraju biti identični. Tako da filogenetski paralelizam ne može sam da objasni zbog čega su iste vrste biljnih vaši parazitirane različitim vrstama parazitoida u različitim geografskim regionima, npr. situacija u Nearktiku i Palearktiku. Starý (1970) objašnjava da ukoliko bi evoluciona interakcija parazitoida i domaćina zaista bila ista, onda bi se u različitim regionima očekivale i identične trofičke asocijacije, a to nije slučaj, jer ne treba zaboraviti i trećeg člana asocijacije, a to su biljke koje u ogromnom broju slučajeva nisu iste. Na osnovu iznetih mišljenja zaključak bi bio da se i biljne vaši i parazitoidi menjaju u toku evolucionog procesa, tako da je pitanje u kom trenutku počinje proces paralelne evolucije još uvek otvoreno.

1.5. Ekonomski značaj afidiina i biološka kontrola

Ekonomski značaj vrsta potfamilije Aphidiinae je svakako veliki, jer je utvrđeno da se mnoge vrste mogu uspešno komercijalno proizvoditi (*Viridaxis*[®].) i koristiti u regulisanju brojnosti biljnih vaši, pre svega, u staklenicima i plastenicima, ali i u otvorenom polju. Problem sa biljnim vašima nije samo direktna šteta koju one mogu naneti biljkama bušenjem tkiva i isisavanjem biljnih sokova, kada se biljka fizički iscrpljuje, već i indirektna. Petrović-Obradović (2003) navodi čitav niz šteta koje nastaju usled prisustva biljnih vaši na biljkama: kovrdžanje listova, hloroze, gale kao posledice bušenja i isisavanja biljnih delova, ali i indirektnih koje nastaju usled kapanja medne rose na donje listove biljke čime se stvara hranljiva podloga za mnoge gljive i bakterije. Na kraju, biljne vaši su i vektori mnogih virusa, od kojih je najpoznatiji „mozaik duvana“. U prirodi, brojnost biljnih vaši regulišu pored parazitoida iz potfamilije Aphidiinae, i neke vrste iz familije Aphelinidae, npr. *Aphelinus mali* (Haldeman), kao i predatori (Chrysopidae, Coccinellidae, Syrphidae) i entomofagne gljive. Parazitoidi su uspešniji kada je mala gustina populacije vaši, u proleće, i kada su domaćini u najranijem razvojnom stupnju, tako da parazitoidi mogu uspešno da se

razviju pre nego domaćin dostigne polnu zrelost i počne da se razmnožava (Wratten & Powell, 1991). Predatori bolje regulišu brojnost domaćina kada je njihova gustina populacije veća (van Lenteren & Woets, 1988). Milne (1988) zaključuje da su afidiine efikasnije, jer su više specijalizovane u pogledu domaćina nego predatori.

Sve do 80-ih godina 20. veka, pesticidi su bili glavno oružje u borbi protiv biljnih vaši. Tokom niza generacija, mnoge vaši su razvile rezistentnost na pesticide. Najpoznatiji primer je vaš pamuka – *Aphis gossypii*. Kao posledica toga, počela su intenzivna istraživanja prirodnih neprijatelja vaši (van Schelt et al., 1990). Pokazalo se da je vrsta parazitoida *A. matricariae* vrlo efikasan biokontrolni agens vaši pamuka (Hagvar & Hofsvang, 1991). Treba napomenuti da pesticidi takođe negativno utiču i na same parazitoide i svu okolnu entomofaunu. Same parazitoidne larve, zatvorene unutar mumija su u izvesnoj meri zaštićene od dejstva pesticida, ali su adulti ranjiviji. Hsieh & Allen (1986) su utvrdili da pesticidi smanjuju dužinu života i plodnost parazitoidnih osa. Na istom polju su radili i McGregor & Mackauer (1989), koji su ispitivali uticaj pesticida na vrstu *Aphidius smithi* Sharma & Subba Rao i zaključili da pesticidi ne menjaju ponašanje ove vrste prilikom traženja domaćina, ali su zato indukovali visoku smrtnost adulta.

Kao uspešan primer suzbijanja biljnih vaši parazitoidima u otvorenim poljima, Messing & Aliniaze (1989) navode parazitiranje lešnikove vaši *Myzocallis coryli* vrstom *Trioxys pallidus* (Haliday), koja je introdukovana iz Evrope u Oregon, SAD. Za biološku kontrolu bananine vaši *Pentalonia nigronervosa* u Južnom Pacifiku, introdukovane su vrste *Lysiphlebus testaceipes* i *Aphidius colemani* kao agensi (Volkl & Stadler, 1991), kao i vrsta *Ephedrus cerasicola* Starý (Starý & Stechmann, 1990).

U plastenicima širom Evrope i Severne Amerike koriste se mnogi parazitoidi kao agensi za biokontrolu štetnih vaši. Hagvar & Hofsvang (1990) navode kao mogućeg agensa za kontrolu vaši *Myzus persicae* u plastenicima vrstu *E. cerasicola*. Ova vrsta je uspešna i za suzbijanje vaši pamuka *Aphis gossypii*. Zatim, vrste *A. matricariae* i *A. colemani* se koriste za suzbijanje vaši *M. persicae* na krastavcu, paprici, paradajzu i raznom drugom povrću (Hagvar & Hofsvang, 1991). Vrsta *L. testaceipes* je introdukovana sa Kube u južnu Francusku 1973/74 (Tremblay, 1984; Starý et al., 1988), i uspešno kontroliše brojnost crne vaši *Toxoptera aurantii*, štetočine limuna u oblasti Mediterana.

Vrsta *Trioxya complanatus* Quilis Perez je introdukovana u Australiju radi suzbijanja vaši *Therioaphis trifolii*, štetočine na lucerki i vaš više ne predstavlja ekonomski problem (Hughes et al., 1987). Takođe, vrsta *Aphidius ervi* je prenetu u Australiju 1977 i postala sve značajniji faktor smrtnosti vrste *Acyrtosiphon kondoi*, sprečavajući rast populacije domaćina u proleće (Milne, 1986).

Diaretiella rapae (M'Intosh) je glavni parazitoid vaši kupusa, *Brevicoryne brassicae*, štetočine na krstašicama širom sveta (Láska, 1984; Nemeč & Starý, 1984; Lopez & van Driesche, 1989; Sheehan & Shelton, 1989).

Mnoge kompanije masovno proizvode afidiine za biološku kontrolu u plastenicima. Pod optimalnim uslovima, vrste rodova *Aphidius*, *Ephedrus*, *Praon* i *Trioxya* mogu da dupliraju veličinu populacije svaka 2-3 dana (Mackauer & Kambhampati, 1988). Sirvastava i Singh (1988) su proučavali uticaj nekih ekstrakata vaši na ponašanje prilikom ovipozicije vrste *Trioxya indicus* Subba Rao and Sharma. Vreme koje je potrebno da parazitoid nađe vaš je bilo smanjeno, što je rezultovalo povećanim brojem domaćina koji su parazitirani. Ovi ekstrakti mogu biti korisni u masovnoj proizvodnji parazitoida.

U staklenim baštama koristi se nekoliko predatora za kontrolu vaši, kao što su *Harmonia* (Coccinellidae), *Aphidoletes aphidimyza* (Cecidomyiidae), *Chrysopa* spp. (Chrysopidae), kao i gljiva *Verticillium lecanii* (Plectosphaerellaceae).

1.6. „Tradicionalna“ i geometrijska morfometrija u istraživanjima afidiina

Pomoću morfometrije se jednostavnim merenjima mogu dobiti podaci o veličini i obliku morfološke celine koji se zatim obrađuju statistički, najčešće multivarijantnim metodama (Rohlf, 1990). Do podataka u „tradicionalnoj“ morfometriji se uglavnom dolazi merenjem dužinskih karakteristika, uglova i površina nekih delova organizma.

Broj karaktera koji se koristi u morfometrijskoj analizi se iz godine u godinu povećava sa povećanjem broja radova vezanih za taksonomiju potfamilije Aphidiinae. Tako se 70-ih godina prošlog veka koristilo svega nekoliko karaktera na krilima parazitoidnih osa, npr., pterostigma, metacarpus, radijalni nerv i dr. (Starý, 1973), da bi

taj broj danas bio znatno veći, oko 15-ak (pored pomenutih i kubitalni, analni, radio-medialni, medio-kubitalni nerv i mnogi drugi) (Kavallieratos et al., 2001).

Međutim, tradicionalna morfometrija ima brojna ograničenja. Jedno od tih je da se linearnim distancama tačaka ne može grafički predstaviti oblik analizirane celine (Ivanović & Kalezić, 2012), koji je važan deo mnogih bioloških istraživanja. Taj problem se može rešiti uz pomoć geometrijske morfometrije, savremenog pristupa u analizi oblika koji je počeo da se primenjuje 80-ih godina prošlog veka (Pretorius, 2005) i za nju se može reći da predstavlja „revoluciju u morfometriji“ (Rohlf & Marcus, 1993).

Geometrijska morfometrija predstavlja korisnu metodu u detekciji i vizualizaciji malih promena u obliku morfoloških celina koje se ne mogu utvrditi tradicionalnim morfometrijskim metodama (Klingenberg, 2002). Takođe, koristi se kao pouzdana metoda za rešavanje taksonomskih problema unutar grupa blisko srodnih vrsta (Baylac & Daufresne, 1996; Baylac et al., 2003; Becerra & Valdecasas, 2004; Mutanen & Pretorius, 2007; Žikić et al., 2009; Cvijanović et al., 2014). Najčešće korišćen karakter u ovim studijama su krila (Klingenberg & Zaklan, 2000; Baylac et al., 2003; Pretorius, 2005; Žikić et al., 2009; Kos et al., 2011; Mitrovski-Bogdanović et al., 2013; Tomanović et al., 2013). Krila insekata su veoma pogodan objekat za geometrijsku morfometriju upravo zbog niza karakteristika kao što su postojanje homologih tačaka na krilnoj nervaturi, dvodimenzionalnost i transparentnost. Geometrijska morfometrija kao metoda se koristi i u botanici za rešavanje problema vezanih za taksonomiju, diverzitet, najčešće analizom oblika lista (Viscosi et al., 2009; Viscosi & Cardini, 2011) i cveta (Shipunov & Bateman, 2005; Niet et al., 2010).

Ono što je razlikuje od „tradicionalne“ morfometrije je pre svega mogućnost definisanja svakog, pa i nepravilnog oblika analiziranog objekta. U geometrijskoj morfometriji oblik je definisan kao ukupna geometrijska informacija koja ostane kada se eliminišu svi efekti položaja, veličine i rotacije objekta (Kendall, 1977). To se postiže skaliranjem na jednu standardnu veličinu, zatim postavljanjem na jednu standardnu poziciju i na kraju rotacijom kako bi svi objekti zauzeli standardnu orijentaciju. Na ovaj način se dobija „čista varijabilnost oblika“ koju je moguće analizirati.

Geometrijska morfometrija se zasniva na identifikaciji tačaka (landmarks) ili koordinata na analiziranoj strukturi i njihovom korišćenju za kvantifikaciju oblika.

Primenom GLS metode (Generalized Least Squares Procrustes Superimposition) uklanjaju se sve razlike uslovljene veličinom, položajem i orijentacijom i zadržavaju samo razlike u obliku (Rohlf & Slice, 1990; Bookstein, 1996). Prokrustovom superimpozicijom, dobija se vrednost veličine centroida “centroid size” (CS), koja je matematički nezavisna od oblika i niz varijabli oblika, odnosno Prokrustove koordinate (Bookstein, 1991; Zelditch et al., 2004). CS se za svako krilo izračunava kao kvadratni koren sume kvadrata rastojanja specifičnih tačaka od središta date konfiguracije (Dryden & Mardia, 1998). Što su tačke udaljenije od centroida i što je njihov broj veći, vrednost veličine centroida je veća (Ivanović & Kalezić, 2012). Prokrustove koordinate se koriste za dalje analize varijabilnosti oblika.

Primenom metode beskonačno tanke, metalne ploče („thin plate spine“ – TPS) i energije potrebne za njenu deformaciju, primenjenom na Prokrustove koordinate, izračunavaju se varijable oblika (Partial Warps – PW i uniformne komponente). Usled razlika u Prokrustovim koordinatama konfiguracija dolazi do deformacije ploče koja se isteže ili skraćuje, širi ili skuplja. Dakle, pomoću ove metode je moguća vizualizacija oblika konfiguracija koje se porede (Ivanović & Kalezić, 2012). Razlike u veličini krila između grupa mogu se ispitati primenom analize varijanse (ANOVA) na CS, a u obliku krila primenom multivarijantne analize varijanse (MANOVA), sa svim varijablama oblika kao zavisno promenljivim. Za utvrđivanje strukture i stepena razlika u obliku između *a priori* definisanih grupa primenjuje se kanonijska diskriminantna analiza, Canonical Variate Analysis (CVA) na svim PW.

1.7. Klasifikacija i filogenetski odnosi unutar potfamilije Aphidiinae

U novijoj literaturi, Aphidiinae imaju status potfamilije (Sanchis et al., 2000; Shi & Chen, 2005). Međutim, Mackauer (1961a) i Starý (1966) su prvobitno izdvajali Aphidiinae kao posebnu familiju u okviru superfamilije Ichneumonoidea, na osnovu specifičnih morfoloških karakteristika (fleksibilna sutura između drugog i trećeg metazomalnog tergita i redukovana krilna nervatura) i parazitiranja isključivo biljnih vaši familije Aphididae. Prvo uključivanje članova grupe Aphidiinae u familiju Braconidae učinili su Edson i Vinson (1979). Oni razmatraju afidiine kao potfamiliju navodeći da su tokom evolucije mogle nastati iz dve nezavisne linije, ističući čak

njihovo polifiletsko poreklo. Međutim, filogenetske studije su pokazale da su afidiine nezavisna grupa unutar familije Braconidae (Quicke & van Achterberg, 1990; Wharton et al., 1992). Morfološki ne postoje bitne razlike između adulta afidiina i ostalih članova familije Braconidae, osim već gore pomenutih, ali kod prvog larvenog stupnja postoji razlika u strukturi respiratornih otvora (Short, 1952; O'Donnell, 1989).

U okviru brakonida, jedino Euphorinae (rodovi *Dinocampus*, *Peristenus*, *Microctonus* i dr) parazitiraju imaga domaćina (npr. Coccinelidae, Chrysomelidae), zbog čega ih mnogi pozicioniraju na vrh filogenetskog stabla brakonida. Međutim, zapaženo je da neke vrste iz potfamilije Aphidiinae pored nimfi, parazitiraju i subadulte kao i adulte, jer se radi o organizmima sa hemimetabolnim razvićem.

Najšire prihvaćena klasifikaciona šema je ona koju je predložio Mackauer (1961a), koji familiju Aphidiidae deli na 4 potfamilije: Ephedrinae, Prinae, Aclitinae i Aphidiinae sa dva tribusa, Aphidiini i Trioxini. S obzirom da je Mackauer tretirao Aphidiinae kao familiju, gore pomenute potfamilije sada predstavljaju tribuse. Rodovi u okviru ovih tribusa se pre svega razlikuju u nervaturi prednjih krila. Ephedrini i Praini imaju brahijalnu ćeliju, a tribusi Aclitini i Aphidiini je nemaju. Tribusi Aclitini i Aphidiini najverovatnije imaju zajedničko poreklo, jer imaju diskokubitalnu ćeliju, koja predstavlja sinapomorfnu karakteristiku (Mackauer, 1961a). Tribus Ephedrini ima potpuno zatvorenu radijalnu ćeliju, zbog čega je najbliži brakonidnim precima Aphidiinae. Dakle, na osnovu morfološko-anatomskih karakteristika, Aphidiinae se mogu podeliti u dva glavna kompleksa, jedan obuhvata tribuse koji pokazuju generalno primitivnije brakonidne osobine (Ephedrini + Praini), kao što je složena nervatura krila, dugi jajnici i ponašanje prilikom ulutkavanja, i drugi koji obuhvata tribuse koji poseduju specijalizovane osobine (Aphidiini + Trioxini), naročito u pogledu njihovog visoko izvedenog reproduktivnog sistema (Le Ralec, 1993), embriologije (Tremblay & Calvert, 1971) i tendencije ka redukciji krilne nervature.

Prva filogenetska istraživanja u domenu biohemijske analize afidiina na rodu *Aphidius*, uradila je Pungertl (1986) elektroforezom nekoliko enzima, pre svega esteraze. Ubrzo, mnogi autori, poput Unruh et al. (1989); Höller (1991) ili Atanassova et al. (1998) daju svoj doprinos u klasifikaciji afidiina na osnovu proteinskih analiza.

Uporedo sa elektroforezom proteina, počinju i prva istraživanja na sekvencama gena. Belshaw & Quicke (1997) su ispitivali filogenetske veze unutar potfamilije i

njihove veze sa ostalim potfamilijama brakonidnih osa korišćenjem podataka sekvenci iz tri gena: elongacioni faktor 1- α , citohrom b i varijabilni segment 28S ribozomalne podjedinice RNK. Došli su do zaključka da su odnosi tribusa unutar potfamilije sledeći: (Ephedrini +(Praini+(Aphidiini+Trioxini))). Tradicionalno, familija Braconidae je podeljena u dve grupe: jedna je jasno definisana ciklostomna koja obuhvata većinom ektoparazitske potfamilije (Doryctinae, Braconinae, Exothecinae i Rogadinae), a druga je heterogena neciklostomna sa većim brojem, uglavnom endoparazitskih potfamilija. Dobijeni rezultati su pokazali da se ciklostomna grupa izdvaja kao posebna, tj. monofiletska klada odvojena od Aphidiinae. Međutim, ostale su nerazjašnjene relacije između afidiina i neciklostomnih potfamilija, a takođe i odnosi unutar same neciklostomne grupe. Rezultati pokazuju da je gubitak unutrašnjeg ulutkavanja kod tribusa Praini nastao sekundarno. Takođe, filogenija dobijena na ovaj način je pokazala da endoparazitizam unutar familije Braconidae ima polifiletsko poreklo. Ove tvrdnje odgovaraju filogenetskoj studiji morfoloških karaktera koju je Whitfield (1992) izneo u svom radu.

Smith et al. (1999) su predstavili filogenetsko stablo za Aphidiinae dobijeno analizom gena za mitohondrijalnu NADH1 dehidrogenazu. Njihova studija je obuhvatala mnogo veći broj vrsta. Za razliku od Belshaw & Quicke (1997), Smith et al. (1999) su ustanovili da je tribus Praini bazalni sa jakim kvantitativnom podrškom. Međutim, niko od autora nije uključio u studije potencijalni bazalni rod, *Aclitus*, koji poseduje brojne pretpostavljene pleziomorfne karaktere (Mackauer, 1961a; Takada & Shiga, 1974). Trotribusnu hipotezu favorizuju i Sanchis et al. (2000) koji su analizirali filogeniju na osnovu sekvence 18S rDNK gena. Rezultati su pokazali da je bazalni tribus Ephedrini, a odnosi u tribusu Aphidiini su ostali nerazjašnjeni, pa predlažu novu filogeniju sa pet tribusa (Ephedrini, Praini, Monoctonini, Trioxini i Aphidiini).

Kambhampati et al. (2000) su rekonstruisali filogeniju afidiina koristeći sekvencu mitohondrijalnog 16S rDNK gena. U analizu su uključili 47 taksona iz 24 roda i sedam taksona van ove grupe. Njihova studija je ukazala na sledeće odnose: *Aclitus* + (Praini + (Ephedrini + Aphidiini)). Iako se rod *Aclitus* izdvojio kao bazalni, bio je predstavljen sa samo jednom vrstom (*A. obscuripennis* Foerster) i njegova pozicija nije imala jaku kvantitativnu podršku. Rezultati Kambhampati et al. (2000) gde

je Praini bazalni rod pre nego Ephedrini, su podudarni sa rezultatima koje su predstavili Smith et al. (1999).

Belshaw et al. (2000) su koristili gen za 16S rRNK u kombinaciji sa D2 regionom 28S rDNK za rasvetljavanje filogenije afidiina i dobijeni rezultati su slični kao kod Kambhampati et al. (2000).

Studija Shi & Chen (2005) je zasnovana na analizi kombinacije tri gena, 16S rRNK, 18S rRNK i gena za ATPazu 6 čime se poboljšava filogenetska preciznost. Rezultati su podržali monofiletsko poreklo Aphidiinae, pri čemu je njen položaj unutar Braconidae najverovatnije takav da je bliža neciklostomnim nego ciklostomnim potfamilijama. Njihovi rezultati se umnogome podudaraju sa rezultatima Sanchis et al. (2000). Takođe, analiza ukazuje da je rod *Aphidius* parafiletska grupa, kao što predlažu i Smith et al. (1999) i Sanchis et al. (2000). Međutim, poreklo ovog roda je još uvek nejasno.

Poslednjih godina rađene su molekularne analize na nižim taksonomskim kategorijama (vrste i njihove relacije unutar roda), ali su ti radovi retki (Sanchis et al., 2001), kao i radovi koji se tiču populacione genetike nekih, sa stanovišta ekonomije, značajnih vrsta, kao što su *Aphidius ervi* i *Diaeretiella rapae* (Vaughn & Antolin, 1998; Hufbauer et al., 2001; Daza-Bustamante et al., 2002; Baker et al., 2003; Baer et al., 2004).

Postoje i brojni radovi koji se bave utvrđivanjem statusa nekih blisko srodnih vrsta. Petrović (2011) je radio analizu blisko srodnih vrsta roda *Aphidius* prilikom rasvetljavanja statusa članova *Aphidius urticae* Haliday kompleksa korišćenjem gena za 16S rRNK i ITS2 spejsera. Takođe, sekvenca mtCOI gena je korišćena za analizu odnosa između tri blisko srodnih vrsta parazitoida (*A. uzbekistanicus*, *A. rhopalosiphi* i *A. avenaphis*) čiji su domaćini vaši na žitaricama (Kos et al., 2011). Iste vrste parazitoida i isti gen su korišćeni u studiji grupe autora (Tomanović et al, 2013), gde je istraživan odnos između genetičkog i fenotipskog variranja ovih vrsta parazitoida. U cilju identifikovanja kriптиčnih vrsta unutar grupe *Praon abjectum* (Haliday), korišćena su dva molekularna markera, sekvenca mitohondrijalnog COI i nuklearnog 28SD2 rRNA gena (Mitrovski-Bogdanović et al., 2013). Stanković et al. (2015) su za ispitivanje genetičke strukture tri blisko srodnih vrsta roda *Adyalitus* (Foerster), *A.*

ambiguus (Haliday), *A. salicaphis* (Fitch) i *A. thelaxis* (Starý) koristilu sekvencu mtCOI gena.

1.8. Rodovi *Aphidius*, *Euaphidius* i *Remaudierea*

Aphidius Nees je najveći rod u okviru potfamilije Aphidiinae (Tomanović et al. 2007) i predstavlja sa stanovišta taksonomije i sistematike vrlo problematičnu grupu. U svetu je opisano oko 60 vrsta, a u Evropi oko 40 (Starý, 1970; Yu et al., 2013). Ovom rodu pripadaju neke od ekonomski najznačajnijih vrsta (Mescheloff & Rosen, 1990), kao prirodni neprijatelji biljnih vaši u agroekosistemima i kao agensi u njihovoj biokontroli u plastenicima ili na otvorenom polju (Starý, 1974; Hagvar & Hofsvang, 1991). I pored velikog broja studija koje su se bavile taksonomijom i sistematikom ovog roda (Marshall, 1896; Eady, 1969; Starý, 1973; Pungertl, 1983, 1984, 1986; Kambhampati & Mackauer, 1988; Pennacchio, 1989; Unruh et al., 1989; Mescheloff & Rosen, 1990; Höller, 1991; Atanassova et al., 1998; Tomanović et al., 1999, 2004, 2007, 2013; Tomanović & Starý, 2001; Tomanović & Kavallieratos, 2002; Kavallieratos et al., 2001, 2004, 2006; Kos et al. 2011; Petrović, 2011), korektna identifikacija nekih vrsta je i dalje problematična. Sa druge strane identifikacija je od ključnog značaja za sva aplikativna istraživanja ali je limitirana vrlo malim brojem karaktera relevantnih za njihovu separaciju: nervatura krila, brazde na prednjem bočnom regionu petiolusa (Eady, 1969), broj antenalnih segmenata, oblik legalice i broj dlaka na ovoju legalice, tentorijalni indeks (Smith, 1944; Starý, 1973) i broj članaka maksilarnih i labijalnih palpusa (Tomanović et al., 2003, 2007).

Poslednjih decenija, pitanje taksonomskog statusa roda *Euaphidius* je pod znakom pitanja. Mackauer (1961b) je na osnovu tentorijalnog indeksa i same biologije ovom taksonu dodelio status roda. Međutim, obe vrste roda *Euaphidius*, *E. cingulatus* (Ruthe 1859) i *E. setiger* Mackauer 1961 su razmatrane u okviru roda *Aphidius*, ali je vrlo malo literaturnih podataka (npr. Starý 1973). Vrsta *E. cingulatus* se uglavnom javlja u literaturi kao *Aphidius cingulatus* (npr. Pennacchio, 1989), ali se mogu naći i različiti sinonimi, kao i revizije statusa (*Aphidius cingulatus* Ruthe 1859, *Aphidius gregarius* Marshall 1872, *Aphidius pterocommae* Ashmead 1889, *Aphidius lachni* Ashmead 1889, *Aphidius pterocommae* Marshall 1896, *Euaphidius cingulatus*

(Mackauer 1961)). Mackauer (1961c) je razmatrao vrstu *A. pterocommae* unutar podroda *Euaphidius*. Međutim, kada je Mackauer (1961b) opisao novu vrstu, *E. setiger*, onda je podrodu *Euaphidius* dodelio rang roda. Vrsta *E. setiger* se u literaturi javlja pod imenom *Aphidius cardui* Marshall var. *aceri* Ivanov 1925, da bi je u reviziji roda *Aphidius*, Starý (1973) opisao kao *A. setiger* (Mackauer 1961). Prema literaturnim podacima vrste *E. cingulatus* i *E. setiger* za razliku od vrsta roda *Aphidius* imaju veću vrednost tentorijalnog indeksa (0.6-0.8), a razlikuju se i na osnovu same biologije (Mackauer, 1961b; Stary, 1973; Pennachio, 1989;). Vrsta *E. cingulatus* isključivo parazitira vaši iz roda *Pterocomma* Buckton 1879 na vrbama i topolama, dok vrsta *E. setiger* parazitira samo afidne domaćine iz roda *Periphyllus* van der Hoeven 1863 na javorima. Vrsta *E. cingulatus* naseljava listopadne i mešovite šume, parkove i avenije sa vrstama roda *Salix* i *Populus*, može se naći i duž obala reka, ribnjaka i oko kanala za navodnjavanje. Vrsta *E. setiger* se može naći u listopadnim i mešovitim šumama, kao i parkovima i avenijama gde ima javora. Obe vrste imaju široko holarktičko rasprostranjene, dok se vrsta *E. cingulatus* može naći još i u neotropskom, a vrsta *E. setiger* u etiopskom regionu (Yu et al., 2013). Kolonije vaši *Pterocomma* žive na kori grana i grančica i to skoro uvek u simbiozi sa mravima (Blackman & Eastop, 1994). *Periphyllus* vaši su obično rasute sa donje strane listova, mada se ponekad javljaju i na gornjoj strani (Starý, 1972). Vrste *E. cingulatus* i *E. setiger* su morfološki veoma slične, tako da ih je teško razlikovati bez prethodnog poznavanja njihovih afidnih domaćina. Međutim, postoje neki karakteri podobni za separaciju ove dve vrste. Primećeno je da se ženke vrsta *E. cingulatus* i *E. setiger* razlikuju u broju antenalnih segmenata, dužini antena, obliku vršnog dela flageluma i obliku trećeg para valvula legalice (Starý, 1973; Pennacchio, 1989). Ženke vrste *E. cingulatus* imaju antene građene od 18-20 (retko 21) segmenata i dopiru do sredine abdomena i vršni deo flageluma nije zadebljao. Broj antenalnih segmenata kod ženki vrste *E. setiger* je 14-15, antene dopiru do kraja prvog tergita i vršni deo je blago zadebljan (Starý, 1973). Treće valvule legalice vrste *E. cingulatus* su umereno zadebljale i zaobljene na vrhu, dok su kod ženki vrste *E. setiger* izduženije (Pennacchio, 1989).

Rod *Remauiderea* Starý koji je do sada predstavljen sa samo jednom vrstom *R. plocamaphidis* Starý, je takođe sa nejasnim taksonomskim položajem zbog morfološke i biološke sličnosti sa vrstama iz rodova *Aphidius* i *Euaphidius* u ključnim taksonomskim

karakterima kao što su nervatura krila i oblik petiolusa. Primećene su neke razlike između pomenutih rodova u obliku i setaciji legalice. Vrste roda *Aphidius* imaju izdužene valvule legalice sa nekoliko kratkih dlačica, dok se kod vrste *R. plocamaphidis* sužavaju na vrhu i imaju nekoliko dugih i kratke dlačice po celoj površini, uključujući i ivice. Vrsta *R. plocamaphidis* parazitira afidne domaćine iz roda *Plocamaphis* Oestlund na različitim vrstama roda *Salix* (Starý et al., 1973). Ova vrsta je do sada nađena samo u Evropi, i to u Francuskoj na vrsti *P. goernitzi* i u Češkoj na *P. flocculosa*.

U pojedinim radovima koji se bave filogenijom potfamilije Aphidiinae uključen je i rod *Euaphidius*. Rezultati već pomenute studije Smith et al. (1999) o filogenetskim odnosima između rodova potfamilije Aphidiinae korišćenjem gena za mitohondrijalnu NADH1 dehidrogenazu, pokazuju da vrsta *E. setiger* predstavlja odvojen takson unutar tribusa Aphidiini koji je blizak kladi koju formiraju vrste iz roda *Aphidius*. U drugoj filogenetskoj studiji koja se zasniva na korišćenju mitohondrijalnog 16S rRNK gena (Kambhampati et al., 2000), uključene su obe vrste roda *Euaphidius* (*E. cingulatus* i *E. setiger*). Rezultati podržavaju status roda *Euaphidius*, ali su i u ovom slučaju oba taksona bliska kladi koju formiraju vrste roda *Aphidius*. Smith & Kambhampati (2000) su istraživali evolucione tranzicije u okviru potfamilije Aphidiinae zasnovane na nekim morfološkim i karakteristikama ponašanja mapiranim na filogenetsko stablo. Zaključili su da rodovi *Euaphidius* i *Aphidius* formiraju zajednički kladu u okviru podtribusa Aphidiina. Derocles et al. (2012) su ispitivali efikasnost dva molekularna markera (mitohondrijalni COI i nuklerani LWRh gen) u preciznom identifikovanju članova potfamilije Aphidiinae, pri čemu je status roda *Euaphidius* ostao nerazjašnjen.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Predmet ove doktorske disertacije je utvrđivanje taksonomskog statusa rodova i vrsta *Euaphidius* Mackauer i *Remaudiera* Starý (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) na osnovu morfološke analize i molekularnih analiza 28S rRNA i COI gena.

Naučni ciljevi istraživanja su:

- utvrđivanje filogenetskih odnosa između rodova *Euaphidius*, *Remaudierea* i *Aphidius* na osnovu 28S rRNK nuklearnog i COI mitohondrijalnog markera
- utvrđivanje taksonomskog statusa samih vrsta unutar rodova
- utvrđivanje seta morfoloških karaktera relevantnih za separaciju pomenutih rodova i vrsta (tentorijalni indeks, krilna nervatura, oblik legalice...)
- utvrđivanje obrazaca variranja oblika i nervature prednjih krila

3. MATERIJAL I METODE

3.1. „Tradicionalna“ morfometrija

Uzorci biljaka na kojima se nalaze kolonije biljnih vaši u kojima se javljaju i žive i mumificirane vaši, su sakupljeni sa lokaliteta na teritoriji sledećih zemalja: Češka Republika, Litvanija, Rusija, Slovenija, Srbija, Švajcarska i Vels. Uzorci su sakupljeni u periodu od 1964-2012, mada je najveći broj sakupljen tokom 2010. Mumificirane biljne vaši stavljane su u plastične kutije i ostavljene oko 20 dana u laboratoriji do izletanja adultnih osa. Održavani su optimalni uslovi za njihovo odgajanje: 22,5°C, 65% relativna vlažnost, 16:8/ svetlost:tama (Kavallieratos et al., 2010). Jedinke parazitoida su dobijene gajenjem 20 vrsta biljnih vaši iz rodova *Acyrtosiphon*, *Microlophium*, *Pterocomma*, *Periphyllus*, *Plocamaphis* i *Sitobion* sa 17 biljnih vrsta (Tabela 1.).

Za analizu tradicionalne morfometrije u radu su korišćene samo ženke i to 211 jedinki vrste *E. cingulatus*, 28 jedinki vrste *E. setiger* i 2 jedinke vrste *R. plocampahidis* (Tabela 1). Od vrsta roda *Aphidius*, korišćene su sledeće: *A. microlophii* (19 jedinki), *A. urticae* (20) i *A. ervi* (20).

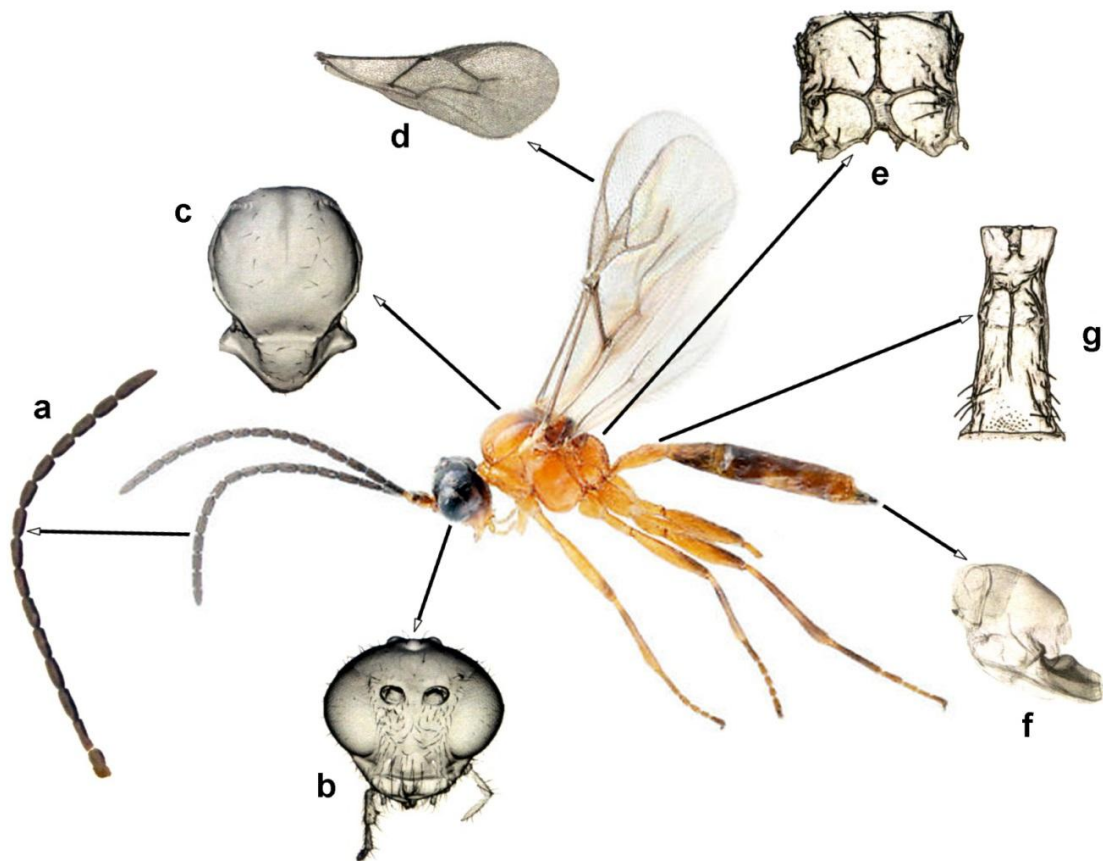
Jedinke vrste *R. plocampahidis* nisu uključene u statističke analize, zbog nedovoljnog broja jedinki, već su samo izmereni karakteri za dijagnozu vrste. Uz pomoć skening elektronskog i svetlosnog mikroskopa analizirana je morfologija navedenih vrsta. Za skening elektronsku analizu jedinke su naparavane zlatnom plazmom u vakuumskoj kapsuli i potom fotografisane uz pomoć JEOL JSM 5300 (California, USA) skening elektronskog mikroskopa. Fotografisane su sledeće morfološke strukture: glava (prednja strana), propodeum, petiolus (dorzalna i bočna strana) i legalica sa bočne strane. Skening elektronska mikroskopija urađena je na Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Za pravljenje mikroskopskih preparata jedinke su prvo obezbojene u 10% kalijum-hidroksidu. Nakon toga su odstranjivana krila koja su se direktno uvodila u 70% etil-alkohol. Ostatak jedinki je kuvan u 10% KOH u vodenom kupatilu na 90-100°C u trajanju od 6 minuta. Zatim je pod binokularnom lupom u plastičnim kadicama vršena disekcija jedinki uz pomoć pincete i entomoloških igala. Delovi tela: glava, antene, mezoskutum, propodeum, petiolus, genitalije su sprovedeni kroz seriju etil-

alkohola rastuće koncentracije od 70, 80, 96 do 99,6%. Dehidrirani delovi tela su montirani na predmetna stakla u privremenom Berlese rastvoru i sušeni 30 dana na temperaturi od 36°C. Analizirani delovi tela su prikazani na slici 1.

Tabela 1. Spisak uzoraka analiziranih vrsta metodama „tradicionalne“ i geometrijske morfometrije. TM - broj jedinki analiziran „tradicionalnom“ morfometrijom, GM – broj jedinki analiziran geometrijskom morfometrijom.

Vrsta	Država	Lokalitet	Datum	Domaćin	Biljka	TM	GM
<i>E. cingulatus</i>	Češka Republika	Česke Budejevice	14.06.1984.	<i>Pterocomma</i> sp.	<i>Salix</i> sp.	20	20
<i>E. cingulatus</i>	Litvanija	Vilnius	18.06.2007.	<i>Pterocomma pilosum</i>	<i>Salix fragilis</i>	8	12
<i>E. cingulatus</i>	Rusija	Pavlovsk-Sankt Peterburg	23.05.2004.	<i>Pterocomma</i> sp.	<i>Salix</i> sp.	10	10
<i>E. cingulatus</i>	Slovenija	Soča	16.06.2009.	<i>Pterocomma pilosum</i>	<i>Populus</i> sp.	20	20
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Stara planina-Babin zub	04.07.2010.	<i>Pterocomma</i> sp.	<i>Salix caprea</i>	7	7
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Kopaonik	27.07.2010.	<i>Pterocomma rufipes</i>	<i>Salix caprea</i>	20	20
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Lebane-Konjino	06.06.2010.	<i>Pterocomma</i> sp.	<i>Populus nigra</i>	15	15
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Niš-Matejevac	03.06.2010.	<i>Pterocomma pilosum</i>	<i>Salix alba</i>	20	20
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Niš-Popovac	22.05.2010.	<i>Pterocomma</i> sp.	<i>Salix babylonica</i>	20	20
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Beograd-Radmilovac	09.05.1998.	<i>Pterocomma populeum</i>	<i>Populus nigra</i>	11	11
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Sićevačka klisura	29.05.2010.	<i>Pterocomma populeum</i>	<i>Populus nigra</i>	20	20
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Sićevačka klisura	29.05.2010.	<i>Pterocomma</i> sp.	<i>Populus alba</i>	20	19
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Vlasinsko jezero	18.06.2010.	<i>Pterocomma pilosum konoii</i>	<i>Salix caprea</i>	20	20
<i>E. cingulatus</i>	Srbija	Vlasinsko jezero	06.08.2010.	<i>Pterocomma salicis</i>	<i>Salix caprea</i>	-	5
<i>E. setiger</i>	Češka	Prag	27.05.1970.	<i>Periphyllus</i> sp.	<i>Acer platanoides</i>	10	-
<i>E. setiger</i>	Srbija	Beograd-Hajd park	16.05.1998.	<i>Periphyllus</i> sp.	<i>Acer campestre</i>	8	8
<i>E. setiger</i>	Srbija	Beograd-Topčider	16.05.1998.	<i>Periphyllus</i> sp.	<i>Acer pseudoplatanus</i>	10	10
<i>E. setiger</i>	Švajcarska	Steinmaur	29.05.2011.	<i>Periphyllus</i> sp.	<i>Acer pseudoplatanus</i>	-	6
<i>E. setiger</i>	Vels	Kardifski zaliv	21.05.2012.	<i>Periphyllus lyopicus</i>	<i>Acer platanoides</i>	-	6
<i>R. plocamaphidis</i>	Češka Republika	Silesia, Nový Dvur	16.06.200.	<i>Plocamaphis flocculosa</i>	<i>Salix</i> sp.	3	-
<i>A. ervi</i>	Srbija	Beograd-Kovilovo	21.06.1992.	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Medicago sativa</i>	20	20
<i>A. ervi</i>	Srbija	Obrenovac	07.06.1990.	<i>Sitobion avenae</i>	<i>Triticum vulgare</i>	-	10
<i>A. microlophii</i>	Srbija	Užice-Ponikovica	01.06.1997.	<i>Microlophium carnosum</i>	<i>Urtica dioica</i>	19	19
<i>A. urticae</i>	Srbija	Beograd	26.04.1998.	<i>Microlophium carnosum</i>	<i>Urtica dioica</i>	20	8



Slika 1. Prikaz delova tela za tradicionalnu morfometriju: a) antena, b) glava, c) mezoskutum, d) krilo, e) propodeum, f) genitalije i g) petiolus (modifikovano po Shukshuk 2012).

Merenje delova tela je izvršeno pomoću LEICA mikroskopa (Leica Application Suite; Version 2.5.0 R1) na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu. U analizama su korišćena 22 karaktera i to 6 merištičkih i 16 kontinuiranih (Tabela 2). Pošto veličina tela ovih parazitoida zavisi prvenstveno od veličine tela domaćina (Cohen et al., 2005), ne bi trebalo analizirati vrednosti dužinskih veličina pojedinih karaktera, već njihove relativne dužine, tj. odnose dužina karaktera. U radu su korišćeni sledeći odnosi karaktera: tent index (Ten/Intt), malarni indeks (Mi 2/Mi 1), H w/Me w, F1 l/F1 w, F2 l/F2 w, F1 l/F2 l, Pt l/Mt l, Pt l/Pt w, Pet l/Pet w.

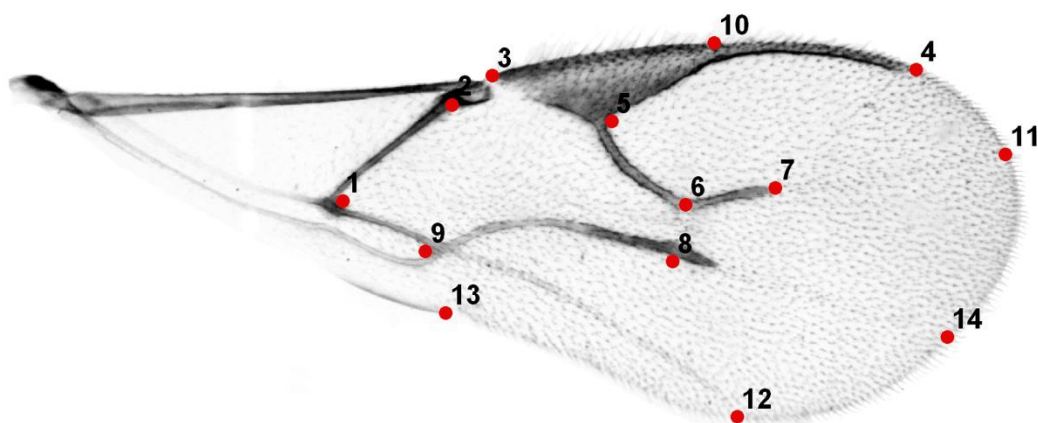
Za sve statističke metode analizirane jedinke su grupisane prema pripadnosti vrsti. Statističke analize obuhvatale su deskriptivnu statistiku i analizu varijabilnosti karaktera pomoću bivarijantnih i multivarijantnih metoda koje su izvršene pomoću programskog paketa STATISTIKA (StatSoft, Inc. 7.0).

Tabela 2. Spisak analiziranih karaktera korišćenih u „tradicionalnoj“ morfometriji.

ŠIFRA KARAKTERA	OPIS KARAKTERA	TIP KARAKTERA
L	Dužina tela	Kontinuirani
H w	Širina glave	Kontinuirani
Mi 1	Uzdužni dijametar oka	Kontinuirani
Mi 2	Malarni prostor	Kontinuirani
Intt	Intertentorijalno rastojanje	Kontinuirani
Ten	Tentoriokularno rastojanje	Kontinuirani
No Mx	Broj palpomera maksilarnih palpusa	Meristički
No Lb	Broj palpomera labijalnih palpusa	Meristički
F1 l	Dužina prvog flagelarnog članka	Kontinuirani
F1 w	Širina prvog flagelarnog članka	Kontinuirani
F1 MPS	Broj mirisnih brazdi na prvom flagelarnom članku	Meristički
F2 l	Dužina drugog flagelarnog članka	Kontinuirani
F2 w	Širina drugog flagelarnog članka	Kontinuirani
F2 MPS	Broj mirisnih brazdi na drugom flagelarnom članku	Meristički
No PRP ua	Broj dlačica u gornjoj areoli propodeuma	Meristički
No PRP la	Broj dlačica u donjoj areoli propodeuma	Meristički
Me w	Širina mezoskutuma	Kontinuirani
Pt l	Dužina pterostigme	Kontinuirani
Pt w	Širina pterostigme	Kontinuirani
Mt l	Dužina metakarpusa (R1 nerva)	Kontinuirani
Pet l	Dužina petiolusa	Kontinuirani
Pet w	Širina petiolusa	Kontinuirani

3.2. Geometrijska morfometrija

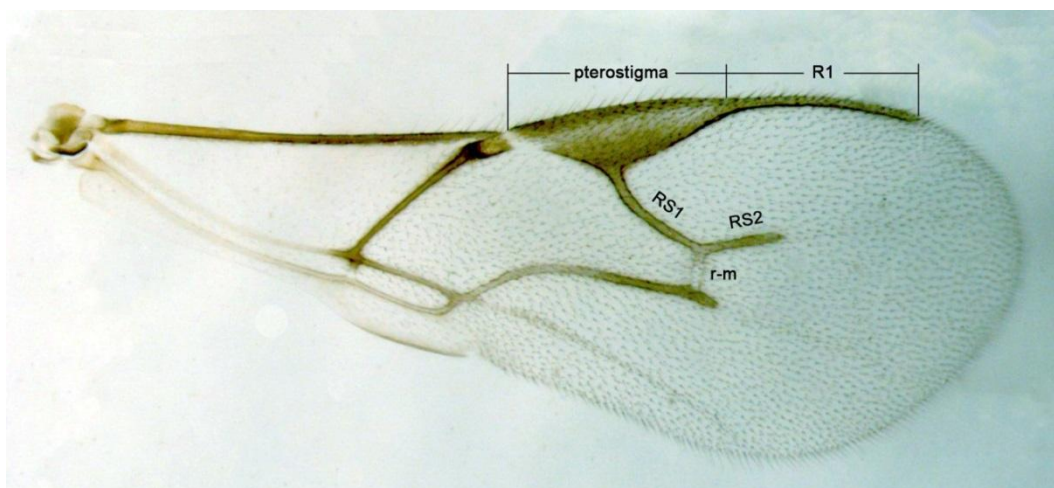
Ukupno je analizirano 305 jedinki koje su grupisane prema vrsti kojoj pripadaju: *E. cingulatus* (219 jedinki), *E. setiger* (29), *A. ervi* (30 jedinki), *A. microlophii* (19) i *A. urticae* (8) (Tabela 1). Za analizu varijabilnosti oblika krila korišćena su samo desna, prednja krila ženki. Na krilima je odabrano 14 dvodimenzionalnih, jasno definisanih tačaka – *landmarks* (Slika 2). Na slici 3 prikazani su analizirani nervi. Krila su fotografisana digitalnom kamerom Leica DFC 290 (Leica Microsystems[©]) na mikroskopu Leica DM 1000 na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu. Homologne tačke su za svako pojedinačno krilo zabeležene uz pomoć softverskog paketa TpsDig2 (Rohlf, 2005).



Slika 2. Prednje krilo *Euaphidius cingulatus* sa obeleženim homolognim tačkama.

Eliminacija razlika uslovljenih veličinom, položajem i orijentacijom krila izvršena je pomoću GLS (Generalized Least Squares Procrustes superimposition) metode u programskom paketu MorphoJ (Klingenberg, 2011) i na taj način je dobijena informacija vezana samo za oblik krila. Pomoću ovog programa su izračunate Prokrustove koordinate i veličina centroida (CS). Metodom beskonačno tanke, metalne ploče i energije potrebne za njenu deformaciju inkorporirane u CVAGEN6 IMP programski paket (Sheets, 2000) izračunate su varijable oblika (PW). Da bi se ispitalo da li postoje statistički značajne razlike u veličini krila primenjena je analiza varijanse (ANOVA) na CS, a u obliku krila, multivarijantna analiza varijanse (MANOVA) na svim varijablama oblika kao zavisno-promenljivim. Za utvrđivanje strukture i stepena

razlika u obliku između *a priori* definisanih grupa primenjena je kanonijska diskriminantna analiza (CVA) na varijablama oblika. Sve statističke analize urađene su u programskom paketu STATISTICA (Stat Soft Inc. 7.0).



Slika 3. Analizirani nervi na prednjem krilu *Euaphidius cingulatus*. R1=metakarpus, RS1 – radijalni sektor 1, RS2 – radijalni sektor 2, r-m (poprečni radio-medialni nerv).

3.3. Molekularne analize

3.3.1. Ekstrakcija DNK

Uzorci korišćeni za analizu filogenetskih odnosa se donekle razlikuju od onih korišćenih u „tradicionalnoj“ i geometrijskoj morfometriji, jer su neki uzorci sadržali mali broj jedinki koje su bile očuvane u 96% alkoholu, a pojedini uzorci korišćeni u morfometriji nisu bili pogodni za molekularne analize, jer su jedinke bile sačuvane samo u suvom stanju. Za rasvetljavanje filogenetskih odnosa rodova *Aphidius*, *Euaphidius* i *Remaudierea*, kao i vrsta unutar ovih rodova, korišćene su sekvence barkoding regiona mitohondrijalnog gena za citohrom oksidazu I (COI) i nuklearnog D2 regiona 28S rRNK. Za analizu je korišćeno ukupno 55 jedinki: *E. cingulatus* (43), *E. setiger* (9) i *R. plocamaphidis* (3). Iz roda *Aphidius*, u analizi COI sekvence korišćene su sledeće vrste: *A. uzbekistanicus* (1), *A. rhopalosiphii* (1) i *A. avenae* (1). Kao autgrupe korišćene su vrste *Areopraon chaitophori* i *Ephedrus blattnyi*. U molekularnoj analizi sekvence 28S rRNK gena korišćene su sledeće vrste roda *Aphidius*: *A. ervi* (1), *A. rhoplaosiphi* (1) i *A. colemani* (1) (Tabela 3). Kao autgrupe korišćene su vrste *Praon dorsale* i *Areopraon silvestre*.

Pre ekstrakcije DNK, najpre je vrhom entomološke igle (prethodno sterilisane) napravljeno nekoliko perforacija na bočnim stranama toraksa i abdomena, pri čemu su jedinke bile položene na predmetno staklo. Postupak je izvođen pod binokularnom lupom. Zatim je osa stavljena u tubicu za ekstrakciju od 0,2 ml sa sledećim miksom: 2 µl KAPA Express Extract enzima, 10 µl 10x KAPA Express Extract pufera, i 38 µl H₂O (Molecular Biology Grade) koji je prethodno izvorteksovan. Zatim je sve to zajedno izmešano na vorteksu. Tubice su stavljene u Termocycler (Eppendorf Mastercycler®) prema sledećem protokolu: 10 min na 75⁰C i 5 min na 95⁰C . Nakon ekstrakcije, tubice su izvorteksovane i iscentrifugirane 1 min na maksimalnom broju obrtaja. Zatim je supernatant u kome se nalazila rastvorena DNK prebačen u tubice od 1,5 ml i kao takva DNK je korišćena odmah u PCR reakcijama ili čuvana u zamrzivaču na -20⁰C.

Tabela 3. Pregled uzoraka korišćenih u molekularnim analizama.

Šifra	Parazitoid	Biljna vaš	Biljka domaćin	Lokalitet	Haplotip COI	Haplotip 28S
M (1,2,3,4)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma pilosum</i>	<i>Salix fragilis</i>	LTU (Vilnius)	C1*	EC*
M (6,7,8)	<i>R. plocamaphidis</i>	<i>Plocamaphis</i> sp.	<i>Salix</i> sp.	CZE	R*	RP*
M (9,10,11,12)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma bicolor</i>	<i>Populus</i> sp.	USA (Vašington, King cd.)	C2*	EC
M(13,14)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma populeum</i>	<i>Populus alba</i>	SRB (Niš, Popovac)	-	EC
M (15,16)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma</i> sp.	<i>Salix</i> sp.	MNE (Plav)	C3*	EC
M (17,18,19)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma jacksoni</i>	<i>Salix caprea</i>	SRB (Vlasinsko jezero)	C1	EC
M (20,21,22,23)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma</i> sp.	<i>Salix</i> sp.	IRN (Karaj)	C1	-
M (24,25,26,27,28)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma pilosum konoii</i>	<i>Salix caprea</i>	SRB (Vlasinsko jezero)	C1	EC
M (29,30,31)	<i>E. setiger</i>	<i>Periphyllus</i> sp.	<i>Acer platanoides</i>	SRB (Niš)	S1*	ES1*
M (32,33,34,35)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma rufipes</i>	<i>Salix caprea</i>	SRB (Kopaonik)	C1	-
M (36,37,38,39)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma salicis</i>	<i>Salix caprea</i>	SRB (Vlasinsko jezero)	C1	-
M (40,41)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma pilosum</i>	<i>Salix alba</i>	SRB (Niš, Matejevac)	-	-
M (42,43,44)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma pilosum</i>	<i>Populus</i> sp.	SLO (Soča)	C3	EC
M (45,46,47,48,49)	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma populeum</i>	<i>Populus nigra</i>	SRB (Sićevočka klisura)	C1	-
M (51,52,53)	<i>E. setiger</i>	<i>Periphyllus</i> sp.	<i>Acer pseudoplatanus</i>	CHE (Steinmaur)	S2*	-
M 54	<i>E. cingulatus</i>	<i>Pterocomma</i> sp.	<i>Populus nigra</i>	PRT (Azorska ostrva-Ponta Delgada)	C1	-
M (55,56,57)	<i>E. setiger</i>	<i>Periphyllus hirticornis</i>	<i>Acer campestre</i>	GBR (Vels, Kardifski zaliv)	-	ES2*

*Pristupni brojevi u banci gena (GenBank): C1- KP698106, C2- KP698107, C3- KP698108, R- KP698110, S1- KP698111, S2- KP698112, EC- KP698113, ES1- KP698114, ES2- KP698115, RP- KP698116.

Da bi se utvrdilo da li je došlo do kontaminacije, prilikom svake ekstrakcije na svakih 10 uzoraka je korišćena negativna kontrola. Tubica negativnih kontrola je sadržala sve reagense neophodne za ekstrakciju i u nju je uronjena sterilisana entomološka igla. Pomoću horizontalne elektroforeze je proveravana uspešnost ekstrakcije DNK uzorka i mogućnost kontaminacije u negativnim kontrolama. Tubice sa negativnom kontrolom su u daljim analizama tretirane kao i ostali uzorci.

3.3.2. Amplifikacija, prečišćavanje i sekvenciranje DNK

Deo gena za subjedinicu I citohrom oksidaze (COI) je umnožen pomoću para prajmera:

LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')

HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al. 1994)

PCR amplifikacija je urađena u zapremini od 25 μ l, koja sadrži 1 μ l ekstrahovane DNK, 12,5 μ l 1 \times KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (sadrži 2 mM MgCl₂ u koncentraciji 1X), 1,25 μ l (0,5 μ M) svakog prajmera i 9 μ l vode (molecular biology grade). Sve tubice su stavljene u Eppendorf Mastercycler® i amplifikacija je vršena po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 5 min, zatim 35 ciklusa od kojih svaki ima tri koraka:

1. 1 min na 94°C
2. 1 min na 54°C
3. 1 min i 30 s na 72°C

i finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 7 minuta.

D2 fragment 28S rRNK je umnožen pomoću para prajmera:

28S rRNKD2f (5'-AGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG-3') (Belshaw et al., 1998)

28S rRNKD2r (5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3') (Campbell et al., 1993)

PCR amplifikacija je urađena u zapremini od 20 μ l, koja sadrži 1 μ l ekstrahovane DNK, 2 μ l High Yield Reaction pufera A (sa 1xMg), 1,5 μ l MgCl₂ (2,25 mM), 0,5 μ l dNTP (0,25 mM), 1 μ l svakog prajmera (0,5 μ M), 0,15 μ l KAPATaq DNK polimeraze (0,0375 U/ μ l) (Kapa Biosystems Inc., USA) i 14,35 μ l vode (molecular biology grade). Amplifikacija je urađena u Eppendorf Mastercycler®-u po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 3 min, zatim 30 ciklusa, svaki sa tri koraka:

1. 30 s na 95°C
 2. 30 s na 48°C
 3. 2 min na 72°C
- i finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 minuta.

Da bi se proverila uspešnost amplifikacije oba gena, kao i da li je došlo do eventualne kontaminacije, 5µl PCR produkta svakog uzorka je pušteno na 1% agaroznom gelu obojenim Midorigreenom (Nippon Genetics) i vizualizovanim pod UV transiluminatorom.

Prečišćavanje amplifikovanih uzoraka izvršeno je pomoću QIAGEN QIAquick® PCR Purification Kit-a prateći upustvo proizvođača. Zatim su prečišćeni uzorci pušteni na horizontalnu elektroforezu (na 1% agaroznom gelu) radi provere njihove čistoće. Molekularna težina i količina DNK određena je vizuelnim poređenjem sa markerom SERVA DNA 100 Bp DNA Ladder. Reakcije sekvenciranja su urađene u Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Amplifikovani COI ili 28S rRNK svakog uzorka je sekvenciran u oba smera upotrebom oba prajmera koja su korišćena za amplifikaciju DNK.

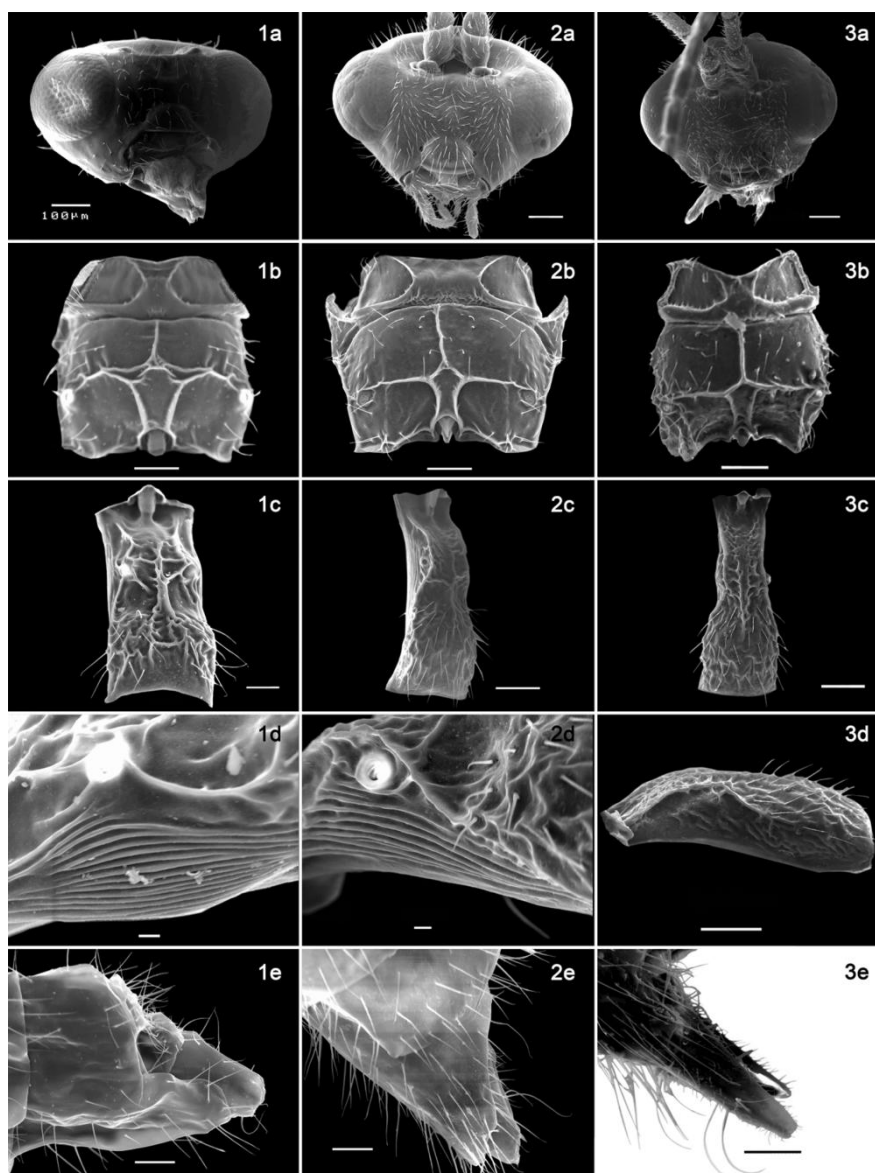
3.3.3. Filogenetske analize

Dobijene sekvence su ručno obrađene (pregled kvaliteta i prevođenje u FASTA format) pomoću programa FinchTV™ (dostupan na <http://www.geospiza.com/>). Poravnanje i međusobno poređenje sekvenci izvršeno je u CLUSTAL W programu integrisanim u softverski paket MEGA5.2 (Tamura *et al.*, 2011). Izračunavanje genetičkih distanci između analiziranih sekvenci je izvedeno pomoću „Kimura’s two-parameter method“ (K2P) uz pomoć „bootstrap“ metode sa 1000 ponavljanja. „Maximum Likelihood“ (ML) i „Maximum Parsimony“ (MP) metode, takođe inkorporirane u MEGA 5.2 programski paket, su korišćene za rekonstrukciju filogenetskih odnosa. U istom programu je za rekonstrukciju filogenetskog stabla ML metodom procenjen najbolji model, i za oba gena je to bio model General Time Reversible sa gama distribucijom (GTR+G). „Bootstrap“ testom u 1000 replikacija je testiran procenat grupisanja sekvenci.

4. REZULTATI

4.1. Skening elektronska mikroskopija

Pomoću skening elektronskog mikroskopa fotografisane su tri jedinke, po jedna ženka vrsta *E. setiger*, *E. cingulatus* i *R. plocamaphidis* (Slika 4).



Slika 4. 1. *Euaphidius setiger*, 2. *Euaphidius cingulatus*, 3. *Remaudierea plocamaphidis*. a) glava – frontalni aspekt; b) propodeum – dorzalni aspekt; c) petiolus – dorzalni aspekt; d) petiolus – lateralni aspekt; e) legalica – lateralni aspekt.

Sa slike se uočava da se vrsta *R. plocamaphidis* razlikuje od preostale dve po bočnom regionu petiolusa na kome nema brazdi, kao i po obliku legalice. Naime, njena legalica je izdužena i postepeno se sužava prema vrhu, dok je kod vrsta *E. cingulatus* i *E. setiger* više zaobljena. Među ostalim karakterima nisu uočene bitne razlike.

4.2. Pregled varijabilnosti morfoloških karaktera

Ukupno je analizirano 298 jedinki podeljenih u pet grupa koje su formirane na osnovu pripadnosti jedinki vrstama: grupa Ec (*E. cingulatus*), grupa Es (*E. setiger*), grupa Am (*A. microlophii*), grupa Au (*A. urticae*) i grupa Ae (*A. ervi*).

U okviru deskriptivne statistike izračunate su srednja vrednost, standardna devijacija, varijansa, standardna greška, minimum i maksimum za ceo uzorak, kao i za svaku grupu. Kontinuirani karakteri su obrađeni kao odnosi vrednosti dva karaktera, dok su meristički analizirani kao celi brojevi. Karakter dužina tela nije analiziran kod svih jedinki, dok su ostali karakteri uglavnom analizirani kod svih jedinki. Rezultati deskriptivne statistike za ceo uzorak su prikazani u tabeli 4. Od merističkih karaktera nisu uključeni u analizu broj maksilarnih i labijalnih palpusa, budući da nijedan od ta dva karaktera nije varirao, tj. sve jedinice imaju po četiri maksilarna i tri labijalna palpusa.

Tabela 4. Deskriptivna statistika za 14 analiziranih karaktera za ceo uzorak (skraćenice videti u tabeli 2).

Karakter	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
L	204	2,018	1,280	2,700	0,064	0,254	0,018
F1 MPS	290	2,266	0,000	6,000	1,953	1,398	0,082
F2 MPS	294	3,396	1,000	7,000	1,654	1,286	0,075
No PRP ua	292	15,757	5,000	34,000	33,917	5,824	0,341
No PRP Ia	293	6,191	2,000	15,000	3,785	1,946	0,114
Ten/Intt	290	0,695	0,333	1,219	0,021	0,145	0,009
H w/Me w	268	1,382	1,102	1,596	0,008	0,088	0,005
F1 I/F1 w	296	2,702	1,625	4,074	0,191	0,437	0,025
F2 I/F2 w	296	2,383	1,571	5,182	0,283	0,532	0,031
Pt I/Mt I	298	1,324	0,874	2,011	0,033	0,181	0,010
Pt I/Pt w	298	3,556	2,538	4,882	0,137	0,371	0,021
Pet I/Pet w	286	4,289	2,694	6,107	0,341	0,584	0,035
F1 I/F2 I	296	1,096	0,614	1,410	0,009	0,097	0,006
Mi 2/Mi 1	289	0,434	0,143	0,642	0,009	0,096	0,006

Iz tabele 4 se uočava da meristički karakteri variraju znatno više nego kontinuirani. Karakter koji najviše varira je broj dlačica u gornjoj areoli propodeuma (No PRP ua) čija je vrednost varijanse 33,917. Od kontinuiranih karaktera najveća varijabilnost se uočava za karakter Pet l/Pet w (varijansa=0,341). Jedan od karaktera koji pokazuje malu varijabilnost unutar celog uzorka je tentorijalni indeks (Ten/Intt) (varijansa=0,021).

Urađena je i deskriptivna statistika za svaku grupu odvojeno da bi se videlo kako variraju pojedini karakteri u zavisnosti od vrste (Tabele 5-18). Prvo su analizirani meristički, a potom i kontinuirani karakteri.

Tabela 5. Deskriptivna statistika za karakter F1 MPS.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	25	2,720	1,000	4,000	1,043	1,021	0,204
Ec	210	2,743	1,000	6,000	1,187	1,090	0,075
Am	19	0,368	0,000	1,000	0,246	0,496	0,114
Au	16	0,063	0,000	1,000	0,063	0,250	0,063
Ae	20	0,250	0,000	2,000	0,303	0,550	0,123
Sve grupe	290	2,266	0,000	6,000	1,953	1,398	0,082

Karakter F1 MPS, odnosno broj mirisnih brazdi na prvom članku (flagolomera) flageluma antene pokazuje najveću varijabilnost unutar Ec grupe (varijansa=1,187) (Tabela 5). Broj rinarija na prvoj flagelomeri je veći kod vrsta roda *Euaphidius* (vrednost minimuma za obe grupe je ista min=0, dok se vrednosti maksimuma razlikuju, odnosno grupa Ec ima 6, a grupa Es 4 rinarije). Skoro sve jedinke iz Au grupe nemaju nijednu mirisnu brazdu na šta ukazuje srednja vrednost (0,063). Vrednost maksimuma za Au i Am grupe je ista (maksimum=1), ali se razlikuje za Ae grupu, s tim što samo jedna jedinka iz ove grupe ima dve rinarije na prvom flagelarnom članku.

Tabela 6. Deskriptivna statistika za karakter F2 MPS.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	27	4,259	2,000	6,000	1,353	1,163	0,224
Ec	210	3,506	1,000	7,000	1,583	1,258	0,087
Am	19	3,158	2,000	5,000	0,696	0,834	0,191
Au	18	2,444	1,000	5,000	1,438	1,199	0,283
Ae	20	2,150	1,000	3,000	0,555	0,745	0,167
Sve grupe	294	3,396	1,000	7,000	1,654	1,286	0,075

Broj mirisnih brazdi na drugom flagelarnom članku (F2 MPS) je veći nego na prvom. Ne postoji nijedna jedinka u okviru grupa koja nema nijednu rinariju. Najveći broj jedinki iz Es grupe ima četiri rinarije. Vrednost varijanse pokazuje najveću varijabilnost u okviru Ec grupe gde se broj rinarija kreće od 1 do 7 (Tabela 6), s tim što samo dve jedinke iz grupe imaju po 7 rinarija, pa je to razlog većeg variranja ovog karaktera unutar ove grupe. Isto važi i za karakter F1 MPS, jer samo dve jedinke Ec grupe imaju po 6 rinarija na prvom članku flageluma. U okviru Ae grupe ni jedna jedinka nema više od 3 mirisne brazde.

Tabela 7. Deskriptivna statistika za karakter No PRP ua.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	26	7,808	5,000	13,000	6,162	2,482	0,487
Ec	210	18,595	6,000	34,000	16,472	4,059	0,280
Am	19	9,053	5,000	13,000	5,164	2,272	0,521
Au	20	9,050	5,000	12,000	4,787	2,188	0,489
Ae	17	8,235	6,000	11,000	2,441	1,562	0,379
Sve grupe	292	15,757	5,000	34,000	33,917	5,824	0,341

Na osnovu rezultata varijanse za ceo uzorak, najveću varijabilnost pokazuje karakter No PRP ua (broj dlačica u gornjoj areoli propodeuma) (varijansa=33,917). Veoma veliku varijabilnost za ovaj karakter pokazuju i jedinke grupe Ec na šta ukazuje vrednost varijanse (16,472). Vrednosti minimuma su kod svih grupa skoro slične (Tabela 7), dok se vrednosti maksimuma drastično razlikuju između Ec (max=34) i svih ostalih grupa (max=11-13), kao i njihove srednje vrednosti. Srednje vrednosti za grupu Ec i za ceo uzorak su približne jedna drugoj. Vrednosti deskriptivne statistike za gotovo

sve karaktere su slične za grupu Ec i za ceo uzorak, što i ne čudi s obzirom da najveći broj analiziranih jedinki u uzorku pripada grupi Ec.

Tabela 8. Deskriptivna statistika za karakter No PRP la.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	26	4,462	3,000	9,000	1,938	1,392	0,273
Ec	211	6,654	2,000	15,000	3,713	1,927	0,133
Am	19	5,842	5,000	9,000	1,474	1,214	0,279
Au	20	4,550	2,000	8,000	2,155	1,468	0,328
Ae	17	5,412	3,000	7,000	1,257	1,121	0,272
Sve grupe	293	6,191	2,000	15,000	3,785	1,946	0,114

Velika varijabilnost unutar celog uzorka je uočena i za karakter No PRP la (Tabela 8). Broj dlačica u donjoj areoli propodeuma je manji nego u gornjoj. Ovaj karakter, kao i prethodni, najviše varira unutar Ec grupe (min=2, max=15). Najveća vrednost minimuma (min=5) je unutar Am grupe.

Tabela 9. Deskriptivna statistika za karakter Ten/Intt.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	28	0,662	0,529	0,818	0,005	0,074	0,014
Ec	210	0,757	0,455	1,219	0,009	0,094	0,006
Am	15	0,425	0,338	0,526	0,003	0,057	0,015
Au	17	0,571	0,402	0,680	0,008	0,091	0,022
Ae	20	0,406	0,333	0,533	0,003	0,052	0,012
Sve grupe	290	0,695	0,333	1,219	0,021	0,145	0,009

U okviru celog uzorka i u okviru svih grupa varijabilnost karaktera Ten/Intt (tentorijalni indeks) je vrlo mala (Tabela 9), na šta ukazuju vrednosti varijanse. Veću vrednost tentorijalnog indeksa pokazuju vrste roda *Euaphidius* (srednja vrednost za Es=0,662, dok je za Ec=0,757), a veće su i njihove vrednosti minimuma i maksimuma. Samo po jedna jedinka iz Es i Ec grupe imaju maksimalnu vrednost tentorijalnog indeksa, odnosno 0,818 i 1,219. U okviru vrsta roda *Aphidius*, jedinke Au grupe imaju veću vrednost Ten/Intt karaktera (srednja vrednost=0,571).

Tabela 10. Deskriptivna statistika za karakter H w/Me w.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	23	1,394	1,228	1,573	0,006	0,077	0,016
Ec	209	1,397	1,177	1,596	0,006	0,080	0,006
Am	17	1,294	1,165	1,418	0,006	0,076	0,018
Au	19	1,285	1,102	1,453	0,009	0,094	0,022
Sve grupe	268	1,382	1,102	1,596	0,008	0,088	0,005

Karakter H w/Me w (odnos širine glave i širine mezoskutuma) pokazuje ujednačenu varijabilnost za obe grupe i ceo uzorak (Tabela 10), tako da ovaj karakter pokazuje priličnu stabilnost u celom uzorku. Vrednosti varijanse i srednje vrednosti su približno iste, nešto veću srednju vrednost za ovaj karakter pokazuju vrste roda *Euaphidius*. Ovaj karakter jedino nije analiziran za Ae grupu.

Tabela 11. Deskriptivna statistika za karakter F1 l/F1 w.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	27	2,373	1,625	2,889	0,073	0,271	0,052
Ec	210	2,549	1,658	3,214	0,065	0,254	0,018
Am	19	3,276	2,759	3,846	0,065	0,255	0,059
Au	20	3,546	3,000	4,074	0,111	0,333	0,074
Ae	20	3,353	3,077	3,833	0,038	0,194	0,043
Sve grupe	296	2,702	1,625	4,074	0,191	0,437	0,025

Dobijene vrednosti deskriptivne statistike za karakter F1 l/F1 w (odnos dužine i širine prvog flagelarnog članka), pokazuju najveću varijabilnost unutar Au grupe (varijansa=0,111) i jedinke ove grupe imaju najizduženiji prvi segment antene (srednja vrednost=3,546). Generalno, jedinke vrsta roda *Aphidius* imaju izduženiji prvi flagelarni članak u odnosu na vrste roda *Euaphidius* (Tabela 11).

Tabela 12. Deskriptivna statistika za karakter F2 l/F2 w.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	27	2,020	1,613	2,409	0,034	0,184	0,035
Ec	210	2,170	1,571	3,214	0,045	0,213	0,015
Am	19	3,166	2,733	3,679	0,072	0,268	0,061
Au	20	3,565	2,895	5,182	0,247	0,497	0,111
Ae	20	3,188	2,667	3,760	0,072	0,269	0,060
Sve grupe	296	2,383	1,571	5,182	0,283	0,532	0,031

Rezultati deskriptivne statistike za karakter F2 l/F2 w (odnos dužine i širine drugog flagelarnog članka) pokazuju istu distribuciju kao i u prethodnom slučaju (Tabela 12). Vrednost varijanse od 0,247 pokazuje da ovaj karakter najviše varira unutar Au grupe. Međutim, samo jedna jedinka u okviru ove grupe ima maksimalnu vrednost za ovaj karakter (5,182), tako da vrednosti deskriptivne statistike u ovom slučaju nisu verodostojne. Najmanji odnos dužine i širine drugog članka antene imaju jedinke Es grupe, raspona od 1,613 do 2,409.

Tabela 13. Deskriptivna statistika za karakter Pt l/Mt l.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	28	1,218	0,943	1,532	0,024	0,155	0,029
Ec	211	1,395	1,035	2,011	0,022	0,147	0,010
Am	19	1,120	0,976	1,307	0,007	0,085	0,019
Au	20	1,050	0,874	1,186	0,008	0,092	0,021
Ae	20	1,190	1,013	1,367	0,011	0,103	0,023
Sve grupe	298	1,324	0,874	2,011	0,033	0,181	0,010

Vrednosti varijanse za karakter Pt l/Mt l (odnos dužine pterostigme i dužine R1 nerva) su male i ovaj karakter veoma malo varira između grupa (Tabela 13). Najdužu pterostigmu imaju jedinke grupe Ec (srednja vrednost=1,395). Iz literaturnih podataka, merenja i zapažanja, primećeno je da jedinke vrste *E. cingulatus* imaju nešto dužu pterostigmu u odnosu na jedinke vrste *E. setiger*, dok su im dužine metakarpusa, odnosno R1 nerva približno jednake. Najmanju srednju vrednost za ovaj karakter imaju jedinke vrste *A. urticae*, što znači da kod ovih jedinki metakarpus i pterostigma imaju približno istu dužinu.

Tabela 14. Deskriptivna statistika za karakter Pt l/Pt w.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	28	3,138	2,538	4,118	0,104	0,322	0,061
Ec	211	3,518	2,828	4,882	0,095	0,308	0,021
Am	19	4,020	3,464	4,478	0,089	0,298	0,068
Au	20	3,974	3,344	4,556	0,078	0,279	0,062
Ae	20	3,690	3,135	4,375	0,101	0,318	0,071
Sve grupe	298	3,556	2,538	4,882	0,137	0,371	0,021

Odnos dužine i širine pterostigme (karakter Pt l/Pt w) definiše njen oblik. Ovaj karakter najviše varira unutar Es grupe (varijansa=0,104), ali zato rezultati srednje vrednosti pokazuju da jedinke ove grupe imaju najkraću i najširu pterostigmu, dok je kod Am grupe suprotno, imaju najizduženiju pterostigmu (srednja vrednost=4,020) (Tabela 14).

Tabela 15. Deskriptivna statistika za karakter Pet l/Pet w.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	26	3,599	2,694	4,444	0,182	0,426	0,084
Ec	211	4,387	2,709	6,107	0,237	0,487	0,033
Am	10	4,740	3,613	6,042	0,496	0,704	0,223
Au	19	4,311	2,940	5,635	0,475	0,689	0,158
Ae	20	3,902	2,698	5,182	0,547	0,739	0,165
Sve grupe	286	4,289	2,694	6,107	0,341	0,584	0,035

Među kontinuiranim karakterima, odnos dužine i širine petiolusa (Pet l/Pet w) pokazuje najveću varijabilnost u uzorku (varijansa=0,341) i vrednosti varijanse se razlikuju između grupa. Najduži petiolus, što se vidi na osnovu rezultata srednje vrednosti, imaju jedinke Am grupe. Vrednosti minimuma su prilično ujednačene, izuzev jedinki Am grupe (3,613), dok se vrednosti maksimuma razlikuju, od 4,4 kod jedinki Es grupe do 6,1 kod Ec grupe. Samo po jedna jedinka Ec, Am i Au grupe imaju maksimalne vrednosti za ovaj karakter (Tabela 15).

Tabela 16. Deskriptivna statistika za karakter F1 l/F2 l.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	27	1,070	0,960	1,260	0,004	0,062	0,012
Ec	210	1,134	0,943	1,410	0,005	0,073	0,005
Am	19	0,944	0,879	1,024	0,001	0,033	0,008
Au	20	0,982	0,614	1,100	0,010	0,099	0,022
Ae	20	0,980	0,893	1,069	0,001	0,036	0,008
Sve grupe	296	1,096	0,614	1,410	0,009	0,097	0,006

Karakter koji veoma malo varira u celom uzorku kao i unutar svake grupe je odnos dužine prvog i dužine drugog flagelarnog članka (F1 l/F2 l). Kod svih grupa prvi i drugi članak su skoro iste dužine ukoliko se pogledaju srednje vrednosti (Tabela 16), tako da ovaj karakter pokazuje veliku stabilnost.

Tabela 17. Deskriptivna statistika za karakter Mi 2/Mi 1.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	28	0,469	0,367	0,562	0,003	0,056	0,011
Ec	210	0,460	0,278	0,642	0,004	0,064	0,004
Am	13	0,232	0,173	0,362	0,004	0,063	0,018
Au	18	0,445	0,306	0,622	0,005	0,074	0,017
Ae	20	0,232	0,143	0,380	0,003	0,055	0,012
Sve grupe	289	0,434	0,143	0,642	0,009	0,096	0,006

Karakter Mi 2/Mi 1 (malarni indeks: odnos malarnog rastojanja i uzdužnog dijametra oka) je karakter koji veoma malo varira u celom uzorku (varijansa=0,009). Vrednosti varijanse su gotovo ujednačene. Jedinke Am i Ae grupe imaju istu srednju vrednost malarnog indeksa (0,232). Preostale tri grupe imaju veću vrednost malarnog indeksa (Tabela 17).

Tabela 18. Deskriptivna statistika za karakter L.

Grupa	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maximum	Varijansa	St. dev.	St. greška
Es	10	1,591	1,400	1,810	0,016	0,126	0,040
Ec	194	2,040	1,280	2,700	0,057	0,239	0,017
Sve grupe	204	2,018	1,280	2,700	0,064	0,254	0,018

Poslednji karakter koji je analiziran je dužina tela (L). Dužina tela je analizirana samo kod jedinki vrsta roda *Euaphidius*. U okviru Es grupe analizirana je samo kod jedinki uzorka sakupljenog na teritoriji grada Beograda (park Topčider). U okviru Ec grupe, dužina tela je izmerena skoro kod svih jedinki. Duže telo imaju jedinke koje pripadaju vrsti *E. cingulatus* (srednja vrednost=2,040) (Tabela 18).

Da bi se utvrdilo da li postoje statistički značajne razlike za karaktere između grupa primenjena je analiza varijanse (ANOVA).

Tabela 19. Analiza varijanse morfoloških karakterata svih grupa. SS-suma kvadrata distanci, MS- suma srednjih vrednosti. Statistička značajnost $p < 0,05$.

Karakter	SS model	df model	MS model	SS residual	df residual	MS residual	F	p
L	1,914	1	1,914	11,141	202	0,05515	34,7064	0,000000
F1 MPS	280,292	4	70,073	284,263	285	0,99741	70,2548	0,000000
F2 MPS	71,096	4	17,774	413,588	289	1,43110	12,4199	0,000000
No PRP ua	6050,146	4	1512,537	3819,590	287	13,30868	113,6504	0,000000
No PRP la	189,497	4	47,374	915,800	288	3,17986	14,8982	0,000000
Ten/Intt	3,858	4	0,964	2,221	285	0,00779	123,7625	0,000000
H w/Me w	0,362	3	0,121	1,720	264	0,00652	18,5056	0,000000
F1 I/F1 w	36,805	4	9,201	19,430	291	0,06677	137,8088	0,000000
F2 I/F2 w	65,621	4	16,405	17,742	291	0,06097	269,0796	0,000000
Pt I/Mt I	4,023	4	1,006	5,695	293	0,01944	51,7477	0,000000
Pt I/Pt w	13,149	4	3,287	27,668	293	0,09443	34,8107	0,000000
Pet I/Pet w	19,437	4	4,859	77,669	281	0,27640	17,5805	0,000000
F1 I/F2 I	1,293	4	0,323	1,456	291	0,00500	64,6259	0,000000
Mi 2/Mi 1	1,528	4	0,382	1,141	284	0,00402	95,0915	0,000000

Iz tabele 19 se zapaža da svi analizirani karakteri pokazuju statističku značajnost.

Osim analize varijanse urađena je multivarijantna analiza varijanse (MANOVA) koja je pokazala statistički značajne razlike između grupa (Tabela 20).

Tabela 20. Multivarijantna analiza varijanse svih analiziranih morfoloških karakterata svih grupa.

Izvor varijabilnosti	Wilks' Lambda	F	Effect df	Error df	p
Vrsta	0,031317	29,421	48	968,9169	0,00

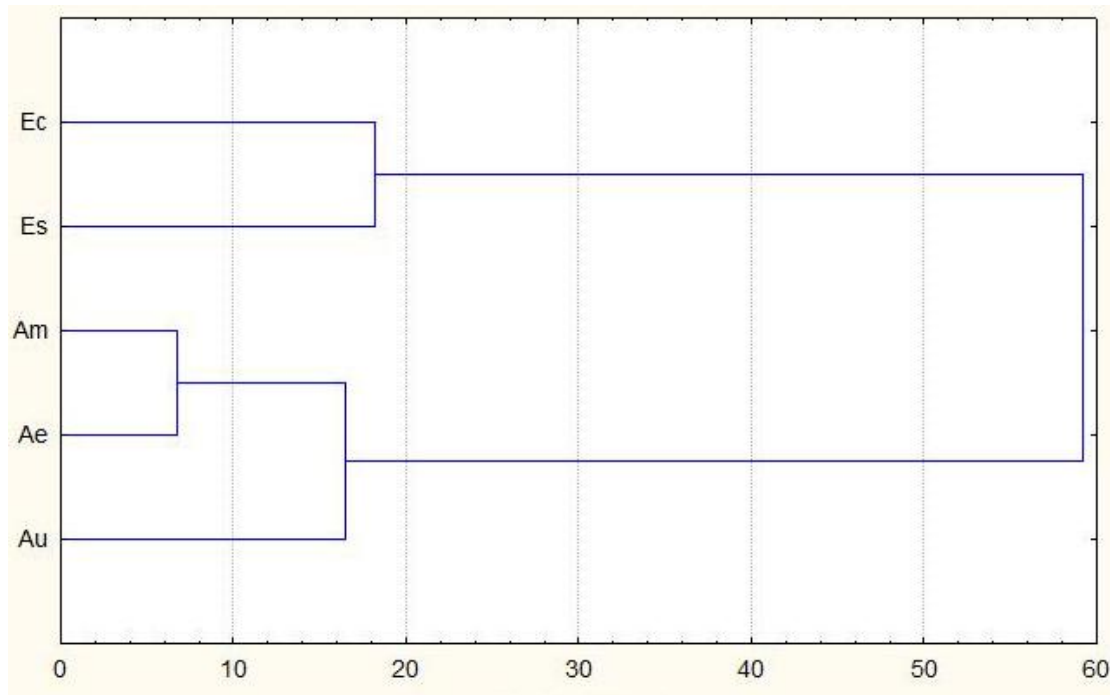
Rezultati diskriminantne kanonijske analize pokazuju duž kojih osa se grupe najbolje razdvajaju i koji karakteri najviše utiču na diskriminaciju grupa koje su definisane *a priori*. Naime, ove ose maksimalizuju međugrupno u odnosu na unutargrupno variranje odabranih karaktera. Analizirane su iste jedinke i grupisane su na isti način kao i u slučaju deskriptivne statistike. Analizom je obuhvaćeno 14 karaktera, dok je faktor grupisanja, kao i u prethodnoj analizi, bila pripadnost vrsti.

Diskriminantnom analizom su dobijene Mahalanobis-ove distance (Tabela 21) koje predstavljaju razdaljine između grupa. Takođe, dobijen je i procenat ispravnosti grupisanja jedinki (Tabela 22), izdvojene su 4 kanonijske ose, izračunate sopstvene (Eigen) vrednosti i procenat ukupne varijanse (Tabela 23).

Dendogram je konstruisan primenom UPGMA metoda na dobijene kvadratne Mahalanobis-ove distance (Slika 5).

Tabela 21. Diskriminantna kanonijska analiza jedinki grupa Ec, Es, Am, Au i Ae.

Kvadratne Mahalanobis-ove distance					
Grupa	Ec	Es	Am	Au	Ae
Ec	0	18,20174	60,81313	67,31107	57,34569
Es	18,20174	0	54,50660	63,94405	50,98996
Am	60,81313	54,50660	0	11,61268	6,70239
Au	67,31107	63,94405	11,61268	0	21,33900
Ae	57,34569	50,98996	6,70239	21,33900	0
F-vrednosti; df = 14,280					
Grupa	Ec	Es	Am	Au	Ae
Ec	0	30,71269	72,35490	83,93622	71,50948
Es	30,71269	0	42,11388	50,92245	40,60634
Am	72,35490	42,11388	0	7,72349	4,45770
Au	83,93622	50,92245	7,72349	0	14,56587
Ae	71,50948	40,60634	4,45770	14,56587	0
p					
Grupa	Ec	Es	Am	Au	Ae
Ec		0,00	0,000000	0,000000	0,000000
Es	0,00		0,000000	0,000000	0,000000
Am	0,00	0,00		0,000000	0,000000
Au	0,00	0,00	0,000000		0,000000
Ae	0,00	0,00	0,000000	0,000000	



Slika 5. UPGMA dendrogram konstruisan iz matrice razlika Mahalanobis-ovih distanci svih grupa.

Na fenogramu (Slika 5) se uočava izdvajanje dve klade na poziciji 59 generalizovane statističke distance. Jednu kladu čine grupe Es i Ec, dok drugu grupe Am, Ae i Au, koje predstavljaju jedinke koje pripadaju vrstama roda *Aphidius*. Na poziciji 17 se jedinke Au grupe izdvajaju od klade koju čine Am i Ae grupe.

Tabela 22. Matrica korektne klasifikacije u unapred definisane grupe. Redovi predstavljaju uočenu pripadnost, a kolone unapred predviđenu pripadnost. „Total“ predstavlja ukupan procenat korektne klasifikacije.

Grupa	% tačnog grupisanja	Ec	Es	Am	Au	Ae
Ec	99,05213	209	1	0	0	1
Es	96,42857	1	27	0	0	0
Am	63,15789	0	0	12	3	4
Au	90,00000	0	0	1	18	1
Ae	80,00000	0	0	4	0	16
Total	94,63087	210	28	17	21	22

U tabeli 22 je dat procenat pravilnog grupisanja. Jedinke grupisane sa velikom tačnošću su jedinke grupa Ec=99,05, Es=96,4 i Au=90%. Samo se jedna jedinka vrste *E. cingulatus* grupiše sa jedinkama vrste *E. setiger* i obratno. Visok procenat ipravnog

grupisanja se javlja i kod Ae grupe (80%), pri čemu četiri jedinke pripadaju grupi Am. Nešto manji procenat ispravnog grupisanja se javlja kod Am grupe i iznosi 63,2%, pri čemu četiri jedinke više pripadaju Ae, nego originalnoj grupi. Tri jedinke pripadaju Au grupi.

Tabela 23. CVA Analiza – standardizovani koeficijenti kanonijskih varijabli.

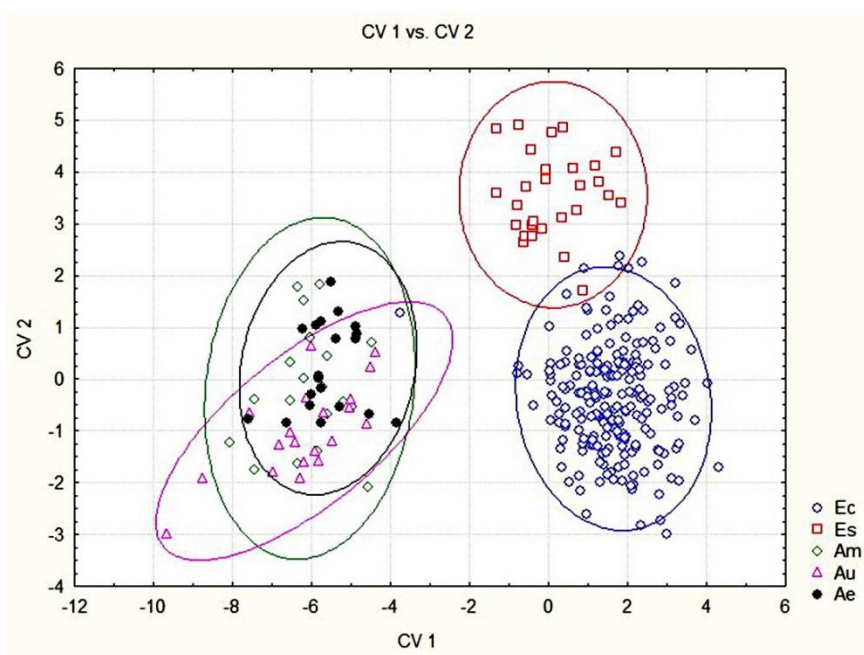
Karakter	CV 1	CV 2	CV 3	CV 4
L	0,135330	0,180107	-0,079128	0,291064
F1 MPS	0,431586	0,149159	0,035828	0,083664
F2 MPS	-0,156129	0,129556	-0,033322	-0,465827
No PRP ua	0,350273	-0,658128	-0,174844	0,183565
No PRP la	-0,119787	-0,182363	-0,148385	-0,357067
Ten/Intt	0,400468	-0,331854	0,106157	-0,022418
H w/Me w	0,146343	0,002605	-0,379943	0,094529
F1 I/F1 w	-0,348960	-0,003588	-0,398438	-0,074385
F2 I/F2 w	-0,342546	-0,577069	0,488925	0,476603
Pt I/Mt l	0,446869	-0,185132	-0,349221	0,171575
Pt I/Pt w	-0,192352	-0,348671	0,225945	-0,585500
Pet I/Pet w	-0,084298	-0,277480	0,002806	-0,449424
F1 I/F2 l	0,296467	-0,306732	0,363382	0,356639
Mi 2/Mi 1	0,048430	0,145050	0,827018	0,042526
Eigenval	9,044545	1,392875	0,708226	0,149715
Cum.Prop	0,800731	0,924045	0,986745	1,000000

Iz tabele 23, gde su predstavljeni rezultati CVA analize vidi se da postoji diskriminacija između analiziranih grupa. Ukupna varijabilnost grupa po svim karakterima je definisana sa 4 kanonijske ose (statistička značajnost prve tri $p=0,000000$, četvrta $p=0,000034$). Prva kanonijska osa nosi najviše razlika između grupa, 80,07%, druga 12,33%, treća 0,06% i četvrta 0,01%. Statistička značajnost pojedinačnih karaktera za prve dve CVA ose (nose više od 90% razlika) ograničena je minimumom 0,3.

Najveću statistički značajnu razliku po prvoj kanonijskoj osi nosi karakter Pt I/Mt l, odnosno odnos dužine pterostigme i dužine metakarpusa, zatim broj rinarija na prvom flagelarnom članku (F1 MPS) i tentorijalni indeks (Ten/Intt). Diskriminaciji među grupama po prvoj kanonijskoj osi takođe doprinose i karakteri broj dlačica u gornjoj areoli propodeuma (No PRP ua), odnos dužine i širine prvog flagelarnog članka (F1 I/F1 w) i odnos dužine i širine drugog flagelarnog članka (F2 I/F2 w). Blizu granice statističke značajnosti je karakter F1 I/F2 l (odnos dužine prvog i dužine drugog članka flageluma). Karakter No PRP ua značajno doprinosi razdvajanju po drugoj kanonijskoj

osi, zatim slede jos 3 karaktera: odnos dužine i širine drugog flagelarnog članka, karakter koji definiše oblik pterostigme (Pt l/Pt w) i tentorijalni indeks. Na granici statističke značajnosti za CV2 osu je odnos dužine prvog i dužine drugog članka flageluma.

Na slici 6 je prikazano razdvajanje grupa po prvoj i drugoj kanonijskoj osi. Elipsama su obuhvaćene jedinice koje pripadaju istoj grupi. Na suprotnim stranama prve kanonijske ose (CV1) se grupišu jedinice koje pripadaju vrstama roda *Aphidius* i jedinice Ec grupe. Grupa Ec je u njenom pozitivnom delu, a grupe Ae, Am i Au u negativnom. Jedinke Es grupe zauzimaju medijalnu poziciju, dok se te iste jedinice jasno razdvajaju od jedinki svih ostalih grupa po drugoj kanonijskoj osi (CV2), pozicionirajući se u njenom pozitivnom delu. Ostale jedinice zauzimaju središnji položaj duž druge kanonijske ose.

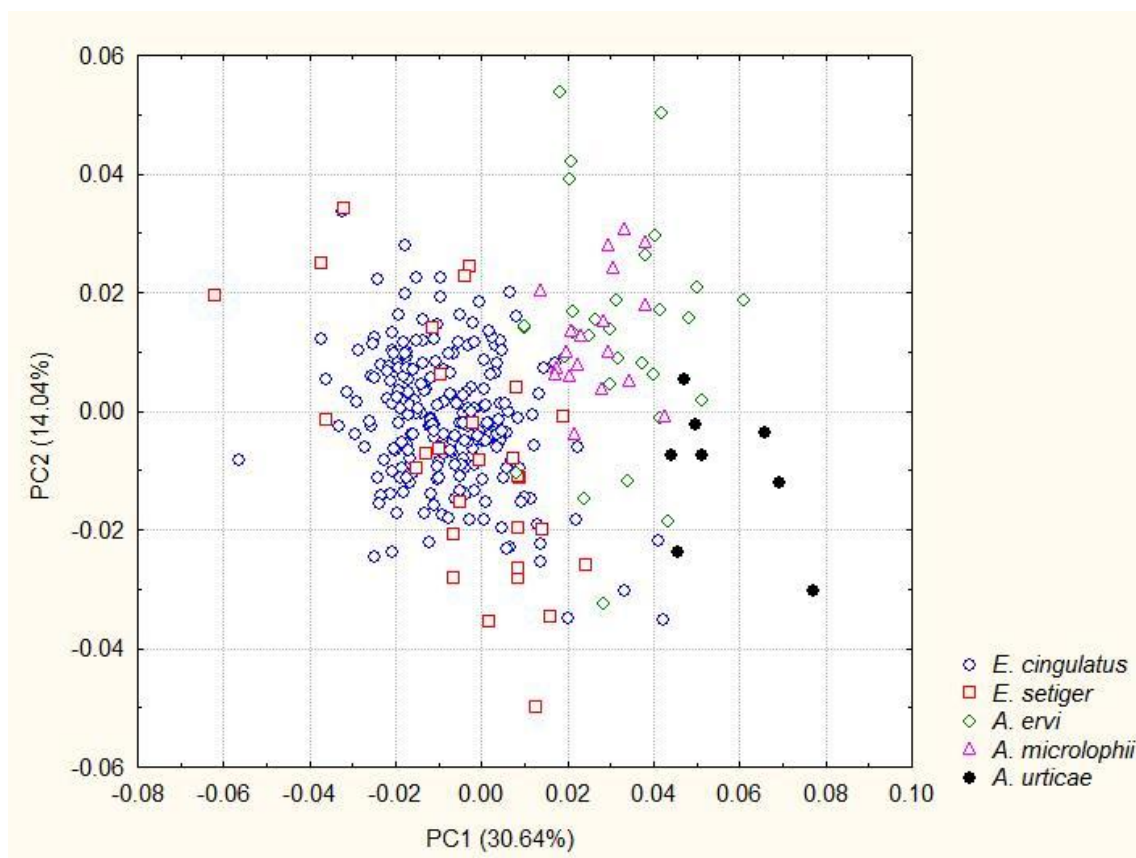


Slika 6. Distribucija jedinki svih grupa duž prve (CV1=80,07) i druge (CV2=12,33) kanonijske ose. Elipse obuhvataju interval od 0,95.

4.3. Analiza oblika krila primenom geometrijske morfometrije

Za analizu varijabilnosti u obliku krila izabrano je 14 homologih tačaka. U programskom paketu TpsRelw je provereno da li je svaka tačka kod svih jedinki pravilno pozicionirana.

Da bi smo ispitali kako se jedinke grupišu na osnovu oblika krila urađena je analiza glavnih komponenti (PCA), dajući ose koje opisuju varijabilnost uzorka. Prva glavna komponenta opisuje procentualno najveću varijabilnost, PC1=30,64%, dok PC2 osa objašnjava 14,04%, a PC3=10,12% varijabilnosti (Slika 7).

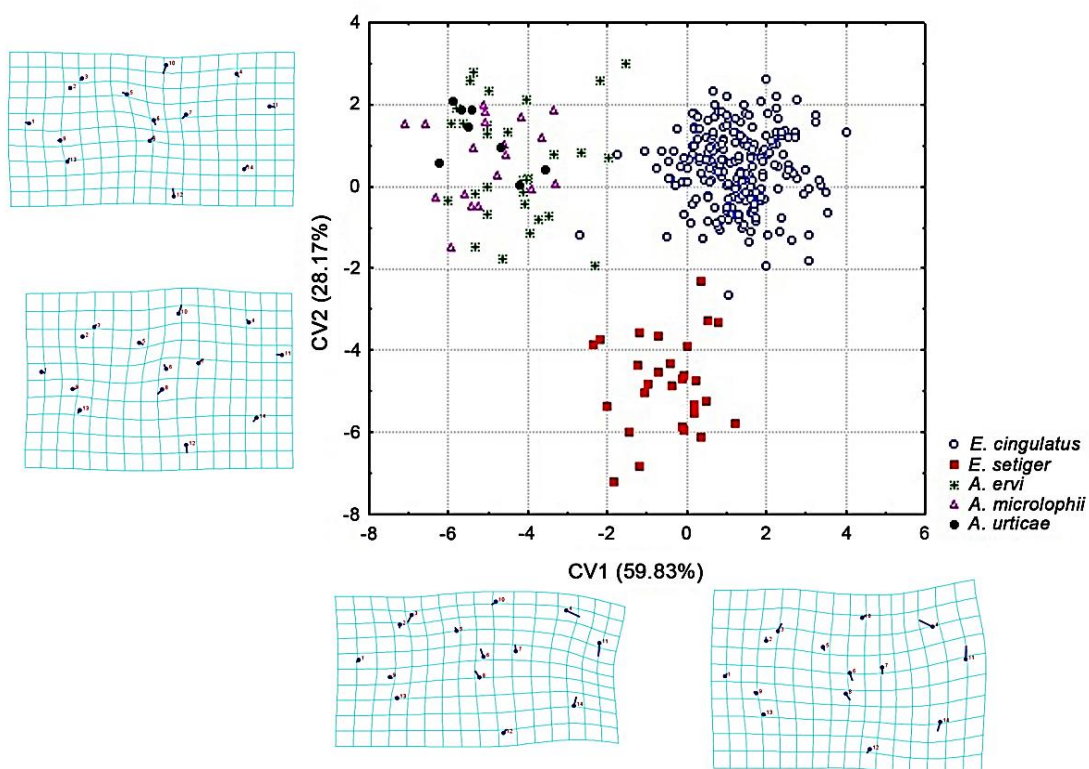


Slika 7. Distribucija jedinki duž prve i druge ose dobijena analizom glavnih komponenti (PCA) varijabilnosti oblika prednjih krila.

Na slici 7 se može uočiti izvesno odvajanje vrsta koje pripadaju rodu *Euaphidius* od ostalih analiziranih vrsta. Jedinke vrsta *E. cingulatus* i *E. setiger* se međusobno preklapaju.

Analiza varijanse (One Way ANOVA test) sa veličinom centroida (CS) kao promenljivom je pokazala statistički značajne razlike u veličini krila između analiziranih vrsta ($F=41,66$; $df=4$; $P<0,00$).

Multivarijantna analiza varijanse sa varijablama oblika kao zavisnim promenljivim je pokazala da postoji statistički značajna razlika u obliku krila kod ispitivanih vrsta (Wilks' $\lambda=0,019724$; $F=19,4$; $P<0,00$).



Slika 8. Položaj jedinki u prostoru definisanom sa prve dve kanonijske ose. Deformacije mreže ilustruju promene oblika krila duž prve i druge kanonijske ose (uvećane za faktor 10).

S obzirom da smo utvrdili da postoji statistički značajna razlika u veličini i obliku, uzorak je dalje analiziran diskriminantnom kanonijskom analizom. Raspored jedinki u morfoprostoru je definisan sa prve dve kanonijske ose. Prva osa objašnjava 59,83% ukupne varijabilnosti oblika krila. Druga osa nosi znatno manji procenat

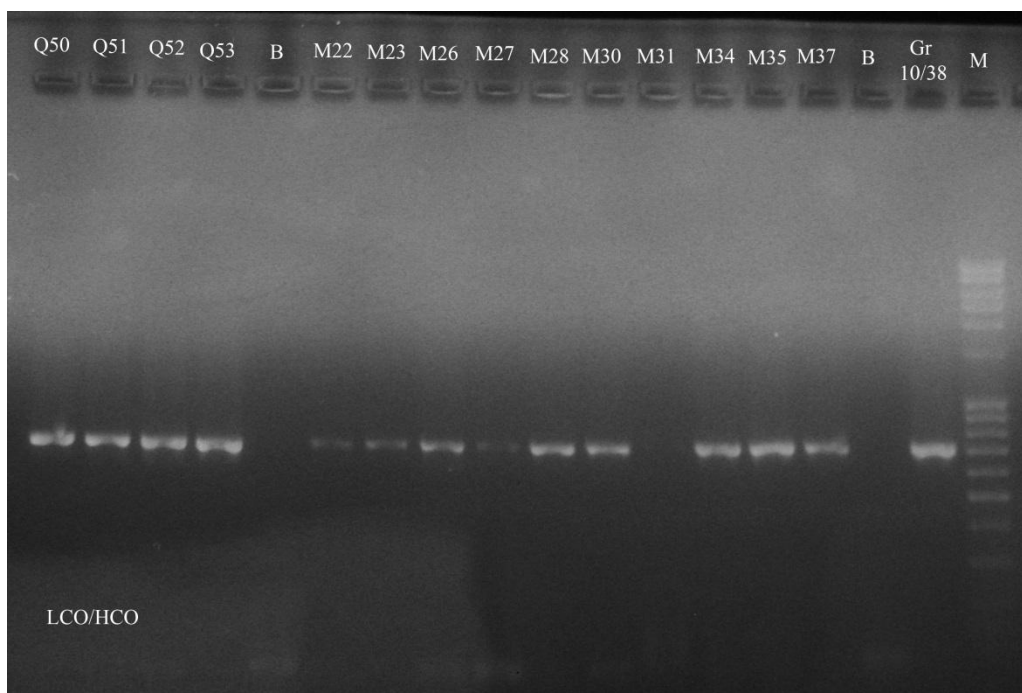
varijabilnosti (28,16%). Pomoću deформacionih mreža je ilustrovana promena u obliku krila duž CVA (Slika 8). Na deформacionim rešetkama su prikazani vektori koji ukazuju na pomeranje tačaka u određenom pravcu koje prati i deформacija rešetke interpolizovanjem duž vektora.

Na slici 8 se jasno uočava da ne dolazi do preklapanja između dve analizirane vrste roda *Euaphidius* (*E. cingulatus* i *E. setiger*), kao ni do njihovog preklapanja sa izabranim vrstama roda *Aphidius*. Posmatrajući raspored jedinki duž prve kanonijske ose uočava se da jedinke koje pripadaju vrstama *E. cingulatus* i *E. setiger* imaju kraći R1 nerv što se može primetiti deформacijom koju izaziva pomeranje tačaka 4 i 10, kao i širu pterostigmu na šta ukazuje blago udaljavanje tačaka 3, 5 i 10. Takođe, ove dve vrste imaju šira krila u središnjem delu (pomeranje tačaka 10 i 12). Tačke 11 i 14 prate trend širenja u istom pravcu tako da doprinose širenju krila u distalnom delu. Promene kod vrsta roda *Aphidius* su obrnute.

Duž druge kanonijske ose zapaža se razdvajanje vrste *E. setiger*, mada ona nosi samo 28,16% varijabilnosti. Jedinke vrste *E. setiger* imaju šira krila u centralnom delu u odnosu na jedinke vrste *E. cingulatus*, što se detektuje pomeranjem tačaka 10 i 12. Takođe, tačka 4 ukazuje da jedinke vrste *E. setiger* imaju nešto kraći R1 nerv. Pomeranje tačaka 5 i 6, kao i 6 i 7 objašnjavaju kraći prvi sektor RS nerva, odnosno duži drugi RS sektor. Nerv koji definišu tačke 6 i 8 (r-m) pokazuje tendenciju izduživanja. Vrsta *E. setiger* ima generalno kraći distalni deo krila (tačka 11). Kod jedinki vrste *E. cingulatus* pomeranje ovih tačaka je obrnuto. Preostale tačke u sva četiri pravca pokazuju zanemarljiva odstupanja.

4.4. DNK analize

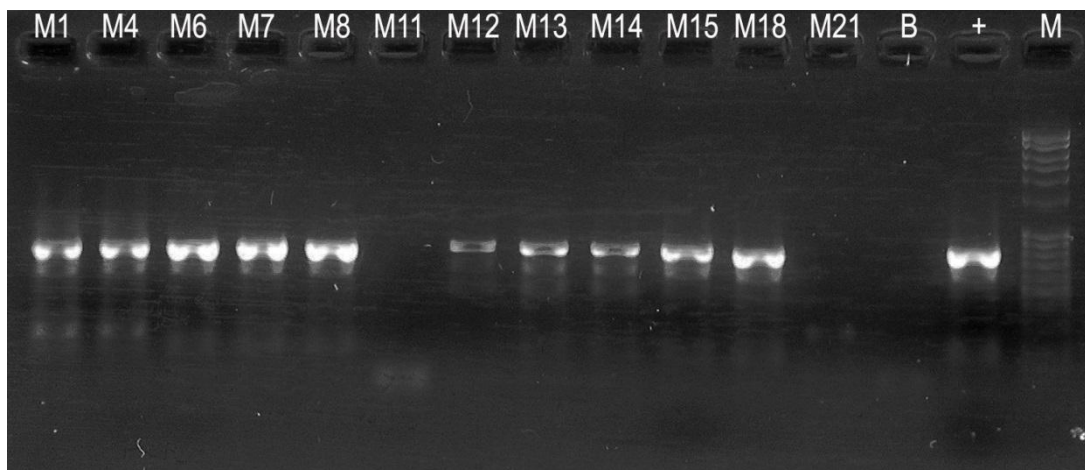
Za razrešenje filogenetskih odnosa analiziranih taksona korišćenjem mitohondrijalnog COI gena obuhvaćeno je 48 jedinki dobijenih gajenjem 14 različitih vrsta biljnih vaši iz 9 zemalja (Tabela 3). Kod svih analiziranih jedinki je uspešno ekstrahovana celokupna DNK. Umnožavanje dela COI gena je bilo uspešno kod 47 jedinki (Slika 9).



Slika 9. PCR produkt COI gena dužine 616-685bp. B – negativna kontrola, Gr10/38 – pozitivna kontrola (*Lysiphlebus fabarum*), M – marker.

Sekvencirani produkt COI gena je bio dužine od 616 do 685 baznih parova. Sekvencirane su 32 jedinke koje pripadaju vrsti *E. cingulatus*, tri koje pripadaju vrsti *R. plocamaphidis* i 5 vrsti *E. setiger*. Sekvence COI gena za vrste roda *Aphidius* (*A. avenae*, *A. colemani*, *A. rhopalosiphi* i *A. uzbekistanicus*) koje su ušle u analizu su preuzete iz banke gena (National Center for Biotechnology Information) (*A. avenae* (Acc. No. JN164785.1), *A. colemani* (Acc. No. HQ724535.1), *A. rhopalosiphi* (Acc. No. JN164779.1) i *A. uzbekistanicus* (Acc. No. JN164736.1)). Kao autgrupe su korišćene vrste *Areopraon chaitophori* (KC128679.1) i *Ephedrus blattnyi* (JN164786.1), čije su sekvence takođe preuzete iz banke gena.

Za analizu filogenetskih odnosa upotrebom 28SD2 regiona korišćene su iste jedinke kao i za COI i još jedan dodatni uzorak iz Velsa. Međutim, sekvenciranje PCR produkta je uspelo samo kod 18 jedinki (Slika 10).



Slika 10. PCR produkt 28SD2 gena dužine 620-867bp. B – negativna kontrola, (+) – pozitivna kontrola (*Praon volucre*), M – marker.

Dužina sekvenciranog produkta je varirala od 620 do 867bp. Sekvencirano je 10 jedinki koje pripadaju vrsti *E. cingulatus*, pet vrsti *E. setiger* i tri vrsti *R. plocamaphidis*. Po jedna jedinka vrsta *Areopraon silvestre* (KC128690.1) i *Praon dorsale* (KJ698464.1) su korišćene kao autgrupe, čije su 28SD2 sekvence preuzete iz banke gena. Sekvence vrsta roda *Aphidius* su takođe preuzete iz banke gena: *A. colemani* (Acc. No. HQ599561.1), *A. ervi* (Acc. No. Z83582.1) i *A. rhopalosiphi* (Acc. No. Z83581.1).

4.4.1. Analiza sekvence mitohondrijalnog COI gena i filogenetska rekonstrukcija

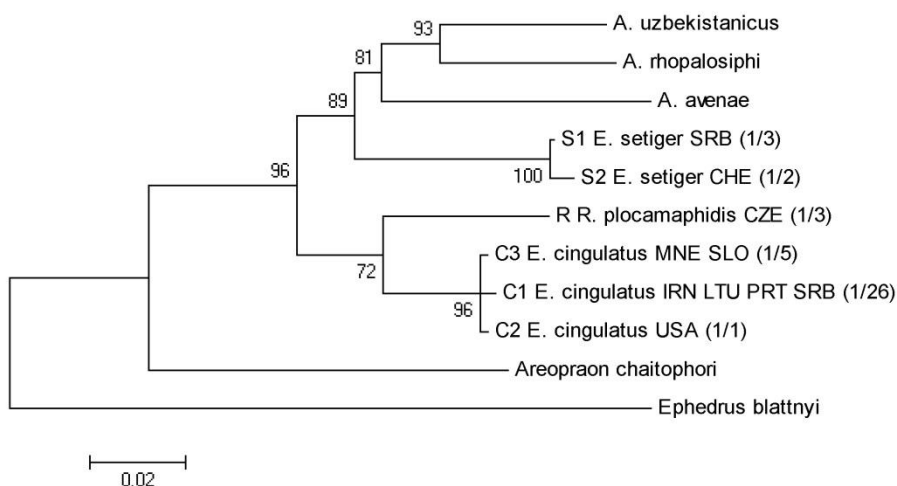
Umnoženi deo COI gena je bio dužine od 616 do 685bp. Nakon međusobnog sravnjavanja sekvenci u ClustalW programu integrisanom u MEGA 5.2 programski paket, dobijena dužina je 616bp.

Nakon analize sekvenci utvrđeno je da mnoge jedinke u okviru analiziranih taksona imaju identičnu COI sekvencu. Izdvojeno je šest haplotipova: tri koja pripadaju vrsti *E. cingulatus* (C1-C3), jedan vrsti *R. plocamaphidis* (R) i dva haplotipa za vrstu *E. setiger* (S1 i S2). Najveći broj jedinki pripada C1 haplotipu (26), C2 haplotip obuhvata samo jednu jedinku, dok pet jedinki pripada haplotipu C3. Sve tri analizirane jedinke vrste *R. plocamaphidis* pripadaju haplotipu R, dok vrsta *E. setiger* obuhvata dva haplotipa, haplotip S1 sa tri i S2 sa dve jedinke. Radi jednostavnijeg i jasnijeg prikaza rezultata pri rekonstrukciji filogenetskih odnosa korišćena je po jedna jedinka svakog haplotipa. Sekvence svakog haplotipa su deponovane u banci gena i njihovi pristupni brojevi se nalaze u tabeli 3.

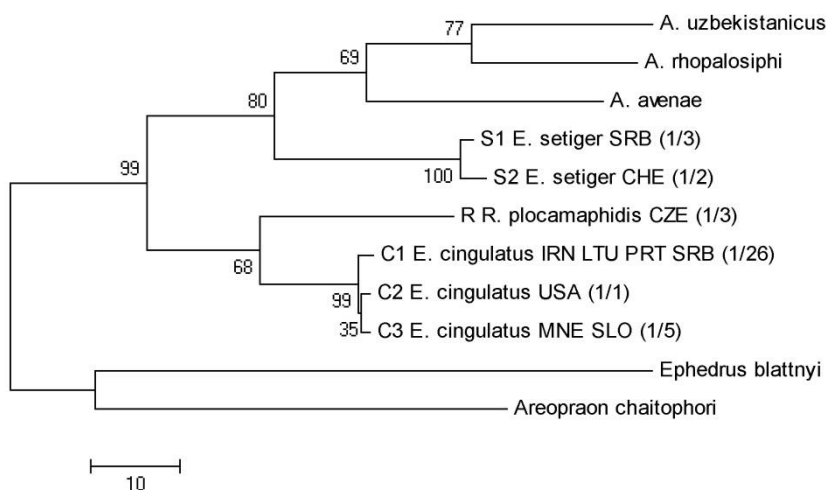
Sve analizirane sekvence za COI gen imaju relativno nizak sadržaj G-C parova, u proseku 24,9% (24,3-27,6%). Ukupan broj varijabilnih mesta u sekvencama je 119, od čega su 87 informativna za parsimoniju, a 32 su tzv. „singleton“ mutacije.

Primenom Maximum-Likelihood metoda (ML), u modelu General Time Reversible sa gama distribucijom (GTR+G) i metoda Maksimalne parsimonije (MP) konstruisana su filogenetska stabla gde se može ispratiti njihovo klasifikovanje i filogenetski položaj. Kao autgrupe korišćene su vrste *Areopraon chaitophori* i *Ephedrus blatnyi*. Filogenetsko stablo dobijeno ML metodom ima sumu dužine grana 2205 (Slika 11). „Bootstrap“ testom u 1000 replikacija je testiran procenat grupisanja sekvenci i dobijene vrednosti su prikazane na nivou grananja.

Metodom Maksimalne parsimonije dobijena su tri moguća stabla, od čega je na slici 12 predstavljeno jedno (dužina=309). Filogenetsko stablo je dobijeno upotrebom „Close-Neighbor-Interchange“ algoritma. Za mesta informativna za parsimoniju indeks konzistencije =0,618605, indeks retencije =0,641921, a kompozitni indeks =0,397096.



Slika 11. Rekonstrukcija filogenetskog stabla haplotipova ML metodom za COI gen. „Bootstrap“ podrška je prikazana iznad/ispod nivoa granjanja. Skala predstavlja broj baznih zamena po mestu (0.02). Pored svakog taksona je prikazano poreklo uzorka, dok je u zagradi prikazan broj jedinki po datom haplotipu.



Slika 12. Rekonstrukcija filogenetskog stabla haplotipova MP metodom za mtCOI gen. „Bootstrap“ podrška je prikazana iznad/ispod nivoa granjanja. Pored svakog taksona prikazano je poreklo uzorka, dok je u zagradi prikazan broj jedinki po datom haplotipu.

Topologija ML filogenetskog stabla pokazuje da se vrste *E. setiger* i vrste roda *Aphidius* grupišu zajedno („bootstrap“ podrška =89%) formirajući dve klade, jednu koju čine jedinke vrste *E. setiger* i drugu koju formiraju vrste roda *Aphidius*. S druge strane haplotip vrste *R. plocamaphidis* i haplotipovi koji pripadaju vrsti *E. cingulatus* se grupišu u dve bliske klade sa vrednošću „bootstrap“ podrške od 72%. U okviru klade *E. cingulatus* se izdvajaju tri grupe. U prvoj grupi su jedinke sakupljene u Crnoj Gori i

Sloveniji sa identičnom COI sekvencom (haplotip C3). U drugoj grupi sve COI sekvence su identične i predstavljene haplotipom C1, dok treću liniju čini sekvenca jedinke sakupljene u SAD (haplotip C2). Posmatrajući oba stabla (Slike 11 i 12) uočava se skoro identična topologija. Postoji izvesna razlika u topologiji haplotipova vrste *E. cingulatus*, gde na ML stablu oni formiraju tri linije, a na MP haplotipovi C2 i C3 formiraju jednu kladu („bootstrap“ podrška mala =35%) koja se grupiše sa haplotipom C1. Sekvence haplotipova C2 i C3 imaju na 479 poziciji guanin, dok haplotip C1 na toj poziciji ima timin, što je dovelo do promene u aminokiselinskom sastavu, tako da haplotipovi C2 i C3 imaju aminokiselinu serin, a haplotip C1 izoleucin. Takođe, C2 i C3 haplotipovi na 598 poziciji imaju citozin, a C1 timin, što je rezultovalo promenom da haplotipovi C2 i C3 imaju prolin, a haplotip C1 ima serin. Haplotip C2 ima na 139 poziciji citozin, dok svi ostali imaju timin, tako da C2 ima arginin, a ostali triptofan. Isti slučaj je i sa haplotipom C3 na poziciji 187, tako da on ima prolin, a ostali haplotipovi serin.

Razlika između haplotipova analiziranih jedinki kvantifikovana je Kimurinim dvoparametarskim (K2P) distancama (Tabela 24).

Tabela 24. Matrica K2P distanci nakon „pairwise“ poređenja sekvenci dela COI gena za haplotipove.

Haplotip	C1	C2	C3	R	S1	S2	Au	Aa	Ar
C1 (<i>E. cingulatus</i>)									
C2 (<i>E. cingulatus</i>)	0,005								
C3 (<i>E. cingulatus</i>)	0,005	0,003							
R (<i>R. plocamaphidis</i>)	0,057	0,056	0,056						
S1 (<i>E. setiger</i>)	0,093	0,093	0,093	0,101					
S2 (<i>E. setiger</i>)	0,097	0,097	0,097	0,104	0,007				
<i>A. uzbekistanicus</i>	0,102	0,104	0,104	0,112	0,091	0,095			
<i>A. avenae</i>	0,104	0,106	0,106	0,110	0,093	0,095	0,093		
<i>A. rhopalosiphi</i>	0,103	0,104	0,104	0,114	0,091	0,095	0,065	0,088	

Srednja vrednost genetičke distance između *E. cingulatus* i *E. setiger* je 9,5%. *R. plocamaphidis* se razlikuje od *E. cingulatus* i *E. setiger* za 5,7%, odnosno 10,2%. Osim toga, vrste roda *Aphidius* se razlikuju od *E. cingulatus* za 10,3% (vrednosti se kreću u rasponu od 10,2 do 10,6%), dok se od *E. setiger* razlikuju u proseku za 9,3% (9,1-9,5%). Srednja vrednost genetičke distance između analiziranih vrsta roda *Aphidius* je približno 8,2% (6,5-9,3%).

Kada su u pitanju distance unutar grupa, one su vrlo male, i unutar *E. cingulatus* iznosi 0,2%, unutar *E. setiger* 0,4%, dok su kod *R. plocamaphidis* sve sekvence identične (Tabela 25).

Tabela 25. Matrica K2P distanci unutar (podebljano) i između analiziranih vrsta roda *Euaphidius* i *Remaudierea* za COI gen.

	<i>R. plocamaphidis</i>	<i>E. cingulatus</i>	<i>E. setiger</i>
<i>R. plocamaphidis</i>	0,000		
<i>E. cingulatus</i>	0,057	0,002	
<i>E. setiger</i>	0,102	0,095	0,004

4.4.2. Analiza sekvence nuklearnog 28SD2 gena i filogenetska rekonstrukcija

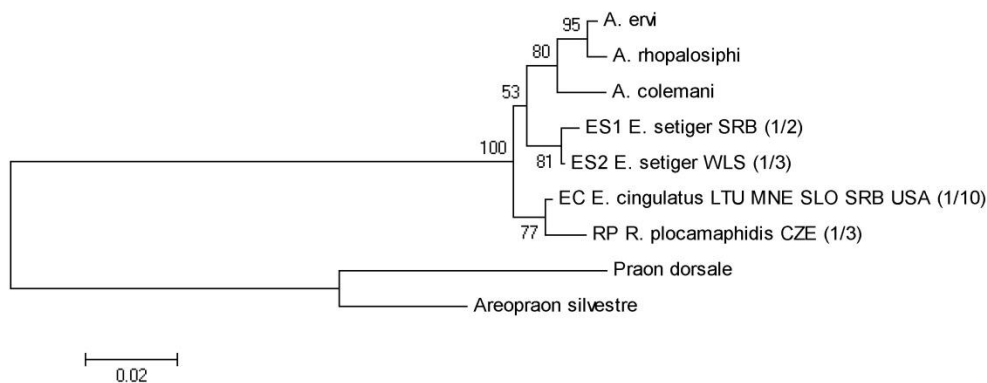
Umnoženi deo 28SD2 gena je bio dužine od 620-867bp. Nakon međusobnog sravnjavanja sekvenci, njihova ukupna dužina je iznosila 596bp.

Kao i u slučaju COI, mnoge od analiziranih jedinki imaju identičnu 28SD2 sekvencu. Dobijeni rezultati pokazuju postojanje četiri haplotipa. Vrsta *E. cingulatus* je predstavljena samo jednim haplotipom EC koji sadrži 10 jedinki, dok haplotip RP koji ima tri jedinke pripada vrsti *R. plocamaphidis*. Haplotipovi ES1 i ES2 sa dve, odnosno tri jedinke predstavljaju vrstu *E. setiger*. Sekvence svakog haplotipa su deponovane u banci gena i njihovi pristupni brojevi se nalaze u tabeli 3.

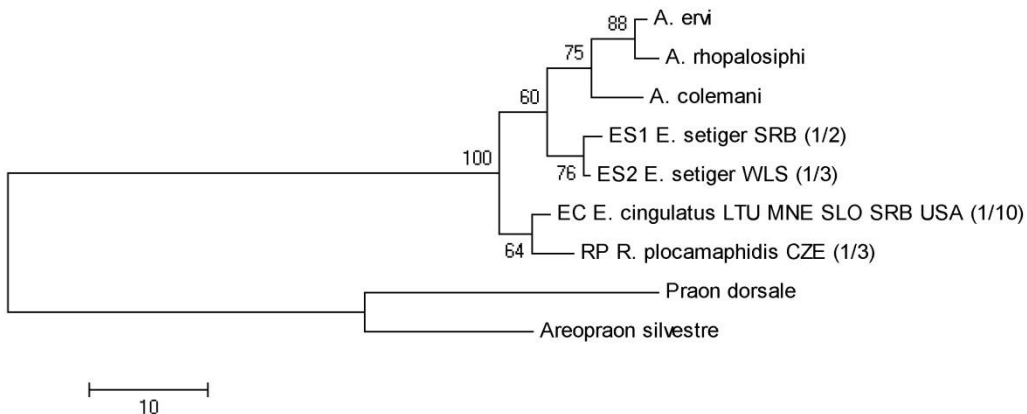
Analiza strukture sekvenci je pokazala da sve sekvence imaju veoma ujednačen sastav nukleotida. Sadržaj G-C parova je 34.5% (33,3-35%), a A-T parova veći 65,6% (65-66,7%). Nakon pregleda nukleotidnih mesta, utvrđeno je postojanje 37 varijabilnih mesta, od čega je 29 informativno za parsimoniju, a 8 su „singleton“ mutacije.

Rekonstrukcija filogenetskih odnosa analiziranih taksona izvedena je primenom Maximum-Likelihood metoda (ML), u modelu General Time Reversible sa gama distribucijom (GTR+G) i metoda Maksimalne parsimonije (MP). Kao autgrupe korišćene su vrste *Praon dorsale* i *Areopraon silvestre*. Na slici 13 predstavljeno je ML stablo sa sumom dužine grana od 1288, dok je na slici 14 predstavljeno MP stablo.

Svaki haplotip je predstavljen sa po jednom jedinkom.



Slika 13. Rekonstrukcija filogenetskog stabla haplotipova ML metodom za 28SD2 gen. „Bootstrap“ podrška je prikazana iznad/ispod nivoa granjanja. Skala predstavlja broj baznih zamena po mestu (0,02). Pored svakog taksona je prikazano poreklo uzorka, dok je u zagradi prikazan broj jedinki po datom haplotipu.



Slika 14. Rekonstrukcija filogenetskog stabla haplotipova MP metodom za 28SD2 gen. „Bootstrap“ podrška je prikazana iznad/ispod nivoa granjanja. Pored svakog taksona je prikazano poreklo uzorka, dok je u zagradi prikazan broj jedinki po datom haplotipu.

Filogenetsko stablo dobijeno upotrebom 28SD2 gena ima identičnu topologiju kao i stablo dobijeno iz analize COI sekvence. Sve vrste roda *Aphidius* obrazuju zajedničku kladu sa relativno visokom vrednošću „bootstrap“ podrška (80% za ML i 75% za MP), dok se sa malom „bootstrap“ podrškom (53% za ML i 60% za MP) izdvaja klada kojoj pripadaju haplotipovi vrste *E. setiger*. Haplotipovi vrste *E. cingulatus* i *R. plocamaphidis* se grupišu zajedno sa vrednošću „bootstrap“ podrške od 77% za ML i 64% za MP.

U tabeli 26 su predstavljene Kimura dvoparametarske (K2P) distance koje predstavljaju razlike među haplotipovima.

Tabela 26. Matrica K2P distanci nakon „pairwise“ poređenja sekvenci dela 28SD2 gena za haplotipove.

Haplotip	EC	RP	ES1	ES2	Ac	Ae	Ar
EC (<i>E. cingulatus</i>)							
RP (<i>R. plocamaphidis</i>)	0,011						
ES1 (<i>E. setiger</i>)	0,022	0,030					
ES2 (<i>E. setiger</i>)	0,022	0,030	0,004				
<i>A. colemani</i>	0,035	0,037	0,030	0,026			
<i>A. ervi</i>	0,026	0,037	0,031	0,028	0,020		
<i>A. rhopalosiphi</i>	0,028	0,039	0,033	0,030	0,022	0,005	

Nakon „pairwise“ poređenja nukleotidnih sekvenci dobijena je genetička distanca između *E. setiger* i *E. cingulatus* od 2,2%. *R. plocamaphidis* se razlikuje od *E. cingulatus* i *E. setiger* za 1,1%, odnosno 3,0%. Genetička distanca između vrsta roda *Aphidius* i *E. setiger* je u proseku oko 2,9%. Vrste roda *Aphidius* se razlikuju od *E. cingulatus* i *R. plocamaphidis* za 2,9, odnosno 3,8%, dok je genetička distanca između analiziranih vrsta roda *Aphidius* rangirana od 0,5 do 2,2%.

U tabeli 27 su date genetičke distance unutar i između analiziranih vrsta.

Tabela 27. Matrica K2P distanci unutar (podebljano) i između analiziranih vrsta roda *Euaphidius* i *Remaudierea* za 28SD2 gen.

	<i>E. cingulatus</i>	<i>R. plocamaphidis</i>	<i>E. setiger</i>
<i>E. cingulatus</i>	0,000		
<i>R. plocamaphidis</i>	0,011	0,000	
<i>E. setiger</i>	0,022	0,030	0,002

5. DISKUSIJA

Sticanje znanja o broju vrsta i njihovoj distribuciji je od ključnog značaja za očuvanje biološke raznovrsnosti (May, 1992). Veliku ulogu u tome imaju naučne discipline, taksonomija i sistematika. Međutim, postoje brojni problemi vezani za upoznavanje biodiverziteta. S obzirom da su insekti vrlo brojni, dolazi do diskontinuiteta između broja vrsta i studija koje se njima bave (Colwell & Coddington, 1995). Takođe, problem je i izbor odgovarajućih metoda, naročito postoji nedoumica da li molekularne analize doprinose razumevanju biodiverziteta i u kojoj meri. Postavlja se i pitanje izbora odgovarajućih molekularnih markera za rešavanje taksonomskih problema.

Parazitoidi, kao agensi biološke kontrole, su važna komponenta terestričnog biodiverziteta. Poznavanje njihove biologije, ekologije, ponašanja i raznosvrnosti je od važnosti za njihovu primenu u programima biološke kontrole. Među njima postoje mnoge blisko srodne vrste, kriptične vrste i kompleksi vrsta (Baylac et al., 2003; Kos et al., 2011; Petrović, 2011; Mitrovski-Bogdanović et al., 2013; Tomanović et al., 2013). Rod *Aphidius* je najveći u okviru potfamilije Aphidiinae i sa nerešenim taksonomskim statusom brojnih vrsta unutar njega. U ranijoj literaturi vrste roda *Euaphidius* (*E. cingulatus* i *E. setiger*) su razmatrane u okviru roda *Aphidius*. Takođe i rod *Remaudierea* je sa problematičnim taksonomskim statusom, usled sličnosti sa prethodno pomenutim rodovima u važnim morfološkim karakteristikama, kao što su krilna nervatura i oblik petiolusa. Međutim, iako je rod *Euaphidius* u ranijim studijama uglavnom sinonimiziran rodom *Aphidius* (Starý, 1973), ipak se *Euaphidius* često spominje u nešto novijim studijama (Atanassova 1997; Pike et al., 2000; Smith & Kambhampati, 2000; Völkl & Mackauer, 2000; Ahmad and Inayatullah, 2006; Tomanović et al., 2006, 2007; Rakhshani et al., 2007; Starý & Havelka, 2008; Talebi et al., 2009; Žikić et al., 2012, 2013).

Da bismo ispitali morfološku i genetičku varijabilnost vrsta rodova *Euaphidius* i *Remaudierea*, kao i da bismo rešili njihov taksonomski status unutar podtribusa Aphidiina upoređujući ih sa drugim članovima podtribusa iz roda *Aphidius*, koristili smo tri različite metode: „tradicionalnu“ i geometrijsku morfometriju, kao i analizu DNK sekvenci barkoding regiona gena za citohrom oksidazu 1 (COI), kao i 28S D2

gena. Mnogi istraživači smatraju da se filogenetski odnosi najbolje mogu rasvetliti kombinovanjem molekularnih podataka i morfoloških karakteristika. Dowton et al. (2002) su istraživali filogeniju familije Braconidae kombinovanjem podataka dobijenih analizom morfoloških karaktera i fragmenata 16S i 28S rDNK gena.

Rezultati skening elektronske mikroskopije i tradicionalne morfometrije dali su prvi signal na postojanje izvesnih razlika između analiziranih grupa. Odabrani morfološki karakteri za sve grupe pokazali su variranje u različitom stepenu. Jedinke vrste *Remaudierea plocamaphidis* se razlikuju od svih jedinki obe analizirane vrste roda *Euaphidius* po skulpturiranosti anterolateralnog dela petiolusa koji je naboran, za razliku od druge dve gde je taj deo sa brazdama. Ovakva morfologija petiolusa je zapažena i kod nekih vrsta roda *Aphidius*, kao što su *A. ervi* i *A. microlophii*, koje su korišćene i u drugim taksonomskim analizama. Takođe, vrsta *R. plocamaphidis* ima izduženu legalicu, znatno suženu prema vrhu. Pretpostavka je da je ovakva građa legalice adaptacija na parazitiranje vaši iz roda *Plocamaphis*, koje proizvode veliku količinu voska da bi se zaštitile od predatora i parazitoida. Do ovakvog zaključka se dolazi komparativnim pregledom pojedinih vrsta iz drugih rodova, npr. *Areopraon*, *Pseudopraon*, *Lysephedrus* (videti Starý, 1976), koje imaju sličnu građu legalice, a parazitiraju takođe vaši sa gustom voštanom oblogom.

Dva morfološka karaktera (broj članaka maksilarnih i labijalnih palpusa) nisu podvrgnuta statističkim analizama, jer je njihov broj bio konstantan kod svih jedinki, odnosno sve grupe su imale četiri članka u maksilarnim i tri u labijalnim palpusima. Ova dva morfološka karaktera predstavljaju najstabilnije karaktere i oni su korišćeni i ranije u morfometrijskim studijama roda *Aphidius*. U svom radu, Petrović (2011) je pri merenju varijabilnosti parazitoida *A. urticae* s. str. grupe takođe koristio ova dva karaktera koja su pokazala veliku stabilnost. Broj segmenata maksilarnih palpusa je inače veoma stabilan karakter unutar roda *Aphidius* (Tomanović et al., 2003), dok su labijalni palpusi najčešće dvo- ili tro-segmentisani.

Meristički karakteri pokazuju veću varijabilnost u odnosu na kontinuirane. Od merističkih karaktera najveću varijabilnost pokazuje broj karaktera u gornjoj areoli propodeuma. Od kontinuiranih karaktera, najstabilniji su $H w/Me w$ (odnos širine glave i širine mezoskutuma), $F1 l/F2 l$ (odnos dužine prvog i dužine drugog flagelnog članka) i $Mi 2/Mi 1$ (malarni indeks). Stabilnost karaktera $H w/Me w$ zabeležena je i u

studiji *Aphidius urticae* kompleksa (Petrović, 2011), kao i karaktera Mi 2/Mi 1, dok se taj karakter pokazao najvarijabilnijim u analizi *Aphidius colemani* kompleksa vrsta (Shukshuk, 2012). Razlog tome može biti ljudski faktor, npr. nepravilno pozicionirana glava na mikroskopskom slajdu, što za posledicu kasnije ima pogrešno merenje uzdužnog dijametra oka, malarnog prostora i drugih mera. Stabilnost F1 l/F2 l karaktera primećena je i u studiji Petrović, 2011 i u studiji Shukshuk, 2012. Ako se osvrnemo na variranje broja članaka palpusa u usnom aparatu u analizama nekih drugih rodova afidiina i tu možemo konstatovati priličnu stabilnost, npr. biotipovi srodnih vrsta roda *Ephedrus* (Žikić, 2008).

Analizom varijanse svih morfoloških karaktera dobijena je statistička značajnost u svim odabranim parametrima. Kanonijskom diskriminativnom analizom izdvojeni su karakteri koji najviše doprinose razdvajanju grupa po prvoj i drugoj kanonijskoj osi. Razlikovanju po prvoj CV osi najviše doprinose sledeći karakteri: odnos dužine pterostigme i dužine metakarpusa (Pt l/ Mt l), zatim broj rinarija na prvom flagelarnom članku (F1 MPS) i tentorijalni indeks (Ten/Intt). Po drugoj CV osi, gde se izdvajaju jedinke vrste *E. setiger* u odnosu na sve ostale analizirane vrste, diskriminaciji doprinose karakteri No PRP ua (broj dlačica u gornjoj areoli propodeuma) i F2 l/F2 w (odnos dužine i širine drugog flagelarnog članka). Jedinke vrste *E. cingulatus* imaju nešto dužu pterostigmu u odnosu na jedinke ostalih analiziranih vrsta. Za ovaj karakter, jedinke *E. cingulatus* se grupišu u pozitivnom delu CV 1 ose. Uz pomoć karaktera F1 MPS moguće je razdvajanje dve grupe, jedne koja ima veći broj rinarija na prvom flagelarnom članku kojoj pripadaju vrste *E. cingulatus* i *E. setiger* i druge sa manjim brojem rinarija, koja obuhvata analizirane vrste roda *Aphidius*. Iako vrsta *E. cingulatus* ima veću vrednost tentorijalnog indeksa (0.6-0.8) u odnosu na ostale analizirane vrste, ovaj karakter se pokazao kao varijabilan i unutar roda *Aphidius* gde se kretao u proseku od 0,3 do 0,6, preklapajući se sa vrednošću TI kod vrste *E. cingulatus* (Starý, 1973; Pungertl, 1986). Vrednost tentorijalnog indeksa za vrstu *E. setiger* iz literaturnih podataka je 0.6-0.8 (Starý, 1973; Pennacchio, 1989), dok su merenja u ovoj studiji pokazala nešto nižu vrednost od 0.5 do 0.75. Iako se karakter broj dlačica u gornjoj areoli propodeuma do sada nije mnogo koristio u morfometrijskim analizama vrsta roda *Aphidius*, u ovoj studiji se pokazao kao značajan dijagnostički karakter izdvajajući vrstu *E. cingulatus* u odnosu na ostale, sa velikom vrednošću maksimuma (max=34). S druge

strane, veći broj dlačica u gornjoj areoli ima i vrsta *R. plocamaphidis* (13-16) u odnosu na vrstu *E. setiger* i ostale analizirane vrste roda *Aphidius*. Na žalost, zbog nedostupnog materijala za ovaj deo analize (samo tri jedinke), izmereni morfometrijski karakteri ove vrste nisu ušli u statističku obradu. Primećeno je da ova vrsta ima najdužu pterostigmu (odnos dužine pterostigme i dužine R1 nerva=1,4-1,7) u odnosu na ostale analizirane vrste.

Na kraju, na osnovu svih odabranih karaktera konstruisan je UPGMA dendrogram, odakle se mogu uočiti dve morfološke grupe *Euaphidius* i *Aphidius*, koje se razlikuju pre svega na osnovu broja rinarija na prvom flagelarnom članku i dužini pterostigme. Takođe, vrste *E. cingulatus* i *R. plocamaphidis* imaju veći broj dlačica u gornjoj areoli propodeuma, dok vrsta *R. plocamaphidis* ima i izduženu legalicu, dok ostale analizirane vrste imaju na vrhu zaobljenu legalicu. Što se tiče tentorijalnog indeksa koji je u literaturi naveden kao najznačajnijij za separaciju vrsta roda *Euaphidius* u odnosu na vrste roda *Aphidius*, on se u ovoj studiji nije pokazao kao relevantan za razdvajanje, jer je malo varijabilan i njegove vrednosti se uglavnom preklapaju između analiziranih vrsta.

Pošto primenom tradicionalne morfometrije nije moguće precizno analizirati oblik krila, a krilo je markantna morfološka karakteristika za utvrđivanje taksonomskog statusa blisko srodnih vrsta, primenjena je metoda geometrijske morfometrije. Iako vrste rodova *Aphidius*, *Euaphidius* i *Remaudierea* imaju isti raspored krilnih nerava, sa spojenom radijalnom i medijalnom ćelijom (videti Starý, 1973), prema rezultatima geometrijske morfometrije detektovane su razlike u obliku i nervaturi krila. Karakteri kao što su dužina R1 nerva i oblik krila su informativni za razdvajanje vrsta *E. cingulatus* i *E. setiger* u odnosu na vrste roda *Aphidius*. Vrste roda *Euaphidius* imaju kraći R1 nerv i šira krila u centralnom i distalnom delu. S druge strane, glavne razlike duž CV2 kanonijske ose ukazuju da se vrsta *E. cingulatus* razlikuje od vrste *E. setiger* užim krilom u centralnom delu i generalno dužim distalnim delom prednjeg krila. Rezultati geometrijske morfometrije u velikom delu podržavaju rezultate „tradicionalne“ morfometrije. Već poređenjem grafika diskriminatne kanonijske analize delova tela i grafika CVA krila, primećuje se da sve vrste roda *Aphidius* obrazuju jedinstven „oblak“, dok se obe vrste roda *Euaphidius* grupišu posebno, ne preklapajući se ni međusobno ni sa ostalim analiziranim vrstama. Poređenjem rezultata analize

pterostigme pomoću „tradicionalne“ morfometrije i geometrijske morfometrije uočavamo da jedinke vrste *E. setiger* imaju užu, ali širu pterostigmu u odnosu na jedinke vrste *E. cingulatus*.

Za rasvetljavanje taksonomskog statusa odabranih vrsta korišćene su sekvence mitohondrijalnog COI i nuklearnog 28S gena. Za ovu analizu su odabrane sekvence dva pomenuta gena, jer su se do sada koristile i u drugim studijama rasvetljavanja odnosa između taksona u okviru potfamilije Aphidiinae. Mitohondrijalni geni su brzoevoluirajući i lako se umnožavaju. COI gen je korišćen u mnogim filogenetskim studijama insekata (videti u radu Simon et al., 1994) na nižim i na višim taksonomskim nivoima, kao i u studijama raznih grupa Hymenoptera (uključujući i familiju Braconidae) (Dowton & Austin, 1994; Dowton et al., 1998). Od nuklearnih gena informativni su 28S, 16S i 18S rRNK. 28S gen je dobar molekularni marker za procenu odnosa na generičkom nivou i nivou potfamilije u okviru familije Braconidae (Belshaw & Quicke, 1997).

Molekularne analize u poređenju sa morfometrijskim analizama pokazuju donekle drugačije pozicije analiziranih vrsta. U ovoj studiji molekularnim analizama su obuhvaćene jedinke vrsta *E. cingulatus*, *E. setiger*, *R. plocamaphidis* i nekoliko vrsta roda *Aphidius*. Kao autgrupe korišćene su vrste rodova *Areopraon*, *Ephedrus*, *Praon* i *Toxares*. Bez obzira na primenjeni metod pri rekonstrukciji filogenetskih odnosa, dobijena su stabla iste topologije. Filogenetsko stablo za COI pokazuje da u okviru vrste *E. cingulatus* postoje četiri haplotipa, koji zajedno sa granom koju čini haplotip vrste *R. plocamaphidis* obrazuju zajedničku kladu. Vrsta *E. setiger*, predstavljena sa dva haplotipa, obrazuje kladu blisku kladi koju obrazuju vrste roda *Aphidius*. Sekvence *E. cingulatus* i *E. setiger* se u proseku razlikuju za 9,5%, izabrane *Aphidius* vrste i *E. setiger* za 9,3%, *Aphidius* i *E. cingulatus* za 10,3%, dok se vrste roda *Aphidius* međusobno razlikuju u proseku za 8,2%. Izračunate genetičke distance između analiziranih vrsta su veoma slične jedna drugoj i sugerišu da trenutne generičke granice ne mogu biti prihvaćene. Ista situacija je i u slučaju filogenetskog stabla rekonstruisanog na osnovu 28SD2 gena. Dobijeno stablo ima istu topologiju kao i COI stablo. Takođe, genetičke distance su slične između analiziranih vrsta. Vrste *E. cingulatus* i *E. setiger* se razlikuju za 2,2%, dok su genetičke distance između analiziranih vrsta roda *Aphidius* i vrsta roda *Euaphidius* i *Remaudierea* između 2,9 i

3,8%, a unutar *Aphidius* vrsta se kreću od 0,5 do 2,2%. Dakle, dobijeni rezultati ne podržavaju generički status niti *Euaphidius* niti *Remaudierea* taksona. Jednom rečju, nema dosledne genetičke razlike između analiziranih rodova *Aphidius*, *Euaphidius* i *Remaudierea*.

Rezultati molekularnih analiza, gde su vrste *E. setiger* i *E. cingulatus* bliske vrstama roda *Aphidius*, nisu u skladu sa rezultatima „tradicionalne“ i geometrijske morfometrije, gde nema preklapanja između analiziranih vrsta roda *Euaphidius*, kao ni njihovog grupisanja sa izabranim vrstama roda *Aphidius*. Nije neuobičajeno među parazitskim osama, da ne postoji podudarnost između morfoloških i genetičkih karakteristika (Quicke & Belshaw, 1999; Sandrock et al., 2011; Tomanović et al. 2013). Jedan od takvih primera je studija koju su objavili Mitrovski-Bogdanović et al. (2013), gde ne postoji veza između velike genetičke razlike vrsta *Praon sambuci* i *P. abjectum* sa jedne strane i varijacija u obliku prednjih krila sa druge strane.

Obe vrste roda *Euaphidius* parazitiraju vaši koje žive na drvetu, tzv. arborikolne vaši. Međutim, arborikolni afidni domaćini se javljaju i kod nekih drugih vrsta iz roda *Aphidius*, kao što su *A. aquilus* i *A. salicis* (Starý, 1973). Völkl i Mackauer (2000) su analizirali ponašanje prilikom polaganja jaja i vreme ovipozicije u mnogim rodovima potfamilije Aphidiinae, i grupisali su rodove *Aphidius* i *Euaphidius* u tzv. “brzo ubadajuću“ grupu sa kratkim vremenom polaganja jaja, manje od 0,5s.

Na osnovu svega do sada iznetog, nije moguće dijagnostifikovati i izdvojiti rod *Euaphidius* morfološki, ekološki, niti genetički. Vrste *E. cingulatus* i *E. setiger* menjaju taksonomski status i ponovo se vraćaju u rod *Aphidius*, i na taj način se potvrđuje mišljenje koje se pojavljuje u literaturu u kojem je rod *Euaphidius* samo sinonim roda *Aphidius*. *Remaudierea plocamaphidis* se premešta u rod *Aphidius*. Međutim, naši rezultati pokazuju izvestan nivo genetičke i morfološke razlike između *A. cingulatus*, *A. plocamaphidis* i drugih *Aphidius* vrsta (uključujući i vrstu *A. setiger*), tako da predlažemo da se zadrži status podroda *Euaphidius* sa vrstama *A. cingulatus* i *A. plocamaphidis* u okviru roda *Aphidius*.

6. ZAKLJUČCI

1. Na osnovu „tradicionalne“ morfometrije utvrđeno je koji odabrani karakteri doprinose razlikama između analiziranih vrsta.
2. Dva najistaknutija karaktera su odnos dužine pterostigme i dužine R1 nerva (Pt l/Mt l) i broj rinarija na prvom flagelarnom članku (F1 MPS).
3. Treći informativan parametar za razdvajanje grupa je broj dlačica u gornjoj areoli propodeuma (No PRP ua).
4. Iako je tentorijalni indeks u literaturnim podacima naveden kao karakter na osnovu koga je i izdvojen rod *Euaphidius*, on se u ovoj studiji nije pokazao relevantnim za potvrđivanje statusa roda.
5. Najstabilniji analizirani karakteri su broj maksilarnih (No Mx) i labijalnih palpusa (No Lb). Sve jedinke su imale četiri maksilarna i tri labijalna palpusa.
6. Primenom geometrijske morfometrije na oblik krila utvrđeno je da *E. cingulatus* i *E. setiger* imaju kraći R1 nerv i šira krila u centralnom i distalnom delu u odnosu na ostale analizirane vrste roda *Aphidius*.
7. Analizom oblika krila utvrđeno je da se vrsta *E. cingulatus* razlikuje od vrste *E. setiger* užim krilom u centralnom delu i dužim distalnim delom prednjeg krila.
8. Vrsta *E. setiger* se po molekularnim analizama grupiše zajedno sa vrstama roda *Aphidius*, dok se vrste *E. cingulatus* i *R. plocamaphidis* grupišu u zajedničku kladu. Genetičke distance između analiziranih vrsta su međusobno slične.
9. Molekularnom analizom na osnovu mtCOI i 28S rRNK gena nisu potvrđene jasne generičke granice.
10. Kombinacija „tradicionalne“ morfometrije, geometrijske morfometrije i molekularne analize dva gena nije potvrdila status roda *Euaphidius*. Sve tri analizirane vrste mogu se priključiti rodu *Aphidius*.

11. Premeštanjem u rod *Aphidius* vrste *E. cingulatus* i *E. plocamaphidis* dobijaju status podroda *Euaphidius* u okviru roda *Aphidius*.

7. LITERATURA

- ACHTERBERG, C. v. 1993. Illustrated key to the subfamilies of the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Zoologische Verhandelingen*. Nationall Natuurhistorisch Museum, Leiden, The Netherlands 1-189.
- ACHTERBERG, C. v. 2013. Fauna Europaea: Hymenoptera: Symphyta + Ichneumonoidea. In Fauna Europaea version 2.6.2, URL <http://www.faunaeur.org>.
- AHMAD, S. & INAYATULLAH, M. 2006. Some new records and a key to the identification of Aphidiinae genera (Braconidae: Hymenoptera) of the NWFP, Pakistan. *Sarhad Journal of Agriculture* 22(4): 691-694.
- ATANASSOVA, P. V. 1997. Checklist of the subfamily Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) from Bulgaria. *Zoologische Mededelingen* 71(24): 287-290.
- ATANASSOVA, P., BROOKES, C. P., LOXDALE, H. D. & POWELL, W. 1998. Electrophoretic study of five aphid parasitoid species of the genus *Aphidius* (Hymenoptera, Braconidae), including evidence for reproductively isolated sympatric populations and cryptic species. *Bulletin of Entomological Research* 88: 3-13.
- BAER, C. F., TRIPP, D. W., BJORKSTEN, T. A. & ANTOLIN, M. F. 2004. Phylogeography of a parasitoid wasp (*Diaeretiella rapae*): no evidence of host-associated lineages. *Molecular Ecology* 13: 1859-1869.
- BAKER, D. A., LOXDALE, H. D. & EDWARDS, O. R. 2003. Genetic variation and founder effects in the parasitoid wasp, *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiidae), affecting its potential as a biological control agent. *Molecular Ecology* 12: 3303-3311.
- BAYLAC, M. & DAUFRESNE, T. 1996. Wing venation variability in *Monarthropalpus buxi* (Diptera, Cecidomyiidae) and the quaternary coevolution of box (*Buxus sempervirens* L.) and its midge: a geometrical morphometric analysis. In: Advances in morphometrics (L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor and D. E. Slice, eds), pp. 285-301. Plenum Press, New York.

- BAYLAC, M., VILLEMANT, C. & SIMBOLOTTI, G. 2003. Combining geometric morphometrics with pattern recognition or the investigation of species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society* 80: 89-98.
- BECERRA, J. M., & VALDECASAS, A. G. 2004. Landmark superimposition for taxonomic identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 267-274.
- BECKAGE, N. E. & GELMAN, D. B. 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Annual Review of Entomology* 49: 299-330.
- BELSHAW, R. & QUICKE, D. L. J. 1997. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 281-293.
- BELSHAW, R., DOWTON, M., QUICKE, D. L. J. & AUSTIN, A. D. 2000. Estimating ancestral geographical distributions: a Gondwanan origin for Aphid parasitoids? *Proceedings of the Royal Society London (B)* 267: 491-496.
- BELSHAW, R., FITTON, M., HERNIOU, E., GIMENO, C. & QUICKE, D. L., 1998. A phylogenetic reconstruction of the Ichneumonoidea (Hymenoptera) based on the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Systematic Entomology* 23: 109-123.
- BLACKMAN, R. L. & EASTOP, V. F. 1994. Aphids on the world's trees: an identification and information guide. CAB International, Wallingford, U.K, pp. 987.
- BOOKSTEIN, F. L. 1991. Morphometric tool for landmark data: Geometry and Biology. Cambridge university press, Cambridge.
- BOOKSTEIN, F. L. 1996. Biometrics, biomathematics and morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology* 58: 313-365.
- BOUCHARD, Y. & CLOUTIER, C. 1985. Role of olfaction in host finding by aphid parasitoid *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Journal of Chemical Ecology* 11: 801-808.
- CALVERT, D. J. & van den BOSCH, R. 1972. Behaviour and biology of *Monoctonus paulensis* (Hymenoptera: Braconidae), a parasite of dactynotine aphids. *Annals of the Entomological Society of America* 65: 773-779.

- CAMPBELL, B. C., STEFFEN-CAMPBELL, J. D. & WAREN, J. H. 1993. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Molecular Biology* 2: 225-237.
- CARTON, Y., POIRIÉ, M. & NAPPI, A. J. 2008. Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science* 15: 67-87.
- CHAU, A. & MACKAUER, M. 1999. Self-superparasitism in the solitary parasitoid *Monoctonus paulensis* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae): proximate mechanisms. *The Canadian Entomologist* 131: 769-777.
- CHAU, A. & MACKAUER, M. 2000. Host-instar selection in the aphid parasitoid *Monoctonus paulensis* (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae): a preference for small pea aphids. *European Journal of Entomology* 97 (3): 347-353.
- COHEN, J. E., JONSSON, T., MÜLLER, C. B., GODFRAY, H. & SAVAGE, V. M. 2005. Body sizes of hosts and parasitoids in individual feeding relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 684-689.
- COLWELL, R. K. & CODDINGTON, J. A. 1995. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. In: *Biodiversity Measurement and Estimation* (D. L. Hawksworth, eds), pp. 101-118. London: Chapman & Hall in association with The Royal Society.
- CVIJANOVIĆ, M., IVANOVIĆ, A., KALEZIĆ, M. L. & ZELDITCH, M. 2014. The ontogenetic origins of skull shape disparity in the *Triturus cristatus* group. *Evolution & Development* 16(5): 306-317.
- DAZA-BUSTAMANTE, P., FUENTES-CONTRERAS, E., RODRÍGUEZ, L. C., FIGUEROA, C. C. & NEIMEYER, H. M. 2002. Behavioural differences between *Aphidius ervi* populations from two tritrophic systems are due to phenotypic plasticity. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104: 321-328.
- DEROCLES, S. A., LE RALEC, A., PLANTEGENEST, M., CHAUBET, B., CRUAUD, C., CRUAUD, A. & RASPLUS, J. Y. 2012. Identification of molecular markers for DNA barcoding in the Aphidiinae (Hym. Braconidae). *Molecular Ecology Resources* 12: 197-208.

- DIGILIO, M. C., ISIDORO, N., TREMBLAY, E. & PENNACCHIO, F. 2000. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *Journal of Insect Physiology* 46: 1041-1050.
- DOLPHIN, K. & QUICKE, D. L. J. 2001. Estimating the global species richness of an incompletely described taxon: an example using parasitoid wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 73: 279–286.
- DOWTON, M. & AUSTIN, A. D. 1994. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 9911-9915.
- DOWTON, M., AUSTIN, A. D. & ANTOLIN, M. F. 1998. Evolutionary relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16S rDNA gene sequences. *Insect Molecular Biology* 7: 129-150.
- DOWTON, M., BELSHAW, R., AUSTIN, A. D. & QUICKE, D. L. J. 2002. Simultaneous molecular and morphological analysis of braconid relationships (Insecta: Hymenoptera: Braconidae) indicates independent mt-tRNA gene inversions within a single wasp family. *Journal of Molecular Evolution* 54: 210–226.
- DRYDEN, I. L. & MARDIA, K. V. 1998. Statistical Shape Analysis, Vol. 4. *John Wiley & Sons*, New York.
- EADY, R. D. 1969. A new diagnostic character in *Aphidius* (Hymenoptera: Braconidae) of special significance in species on pea aphid. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London, B* 38: 165-173.
- 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.
- EDWARDS, L. J., SIDALL, J. B., DUNHAM, L. L., UDEN, P. & KISLOW, C. J. 1973. Trans-Beta-Farnesene, alarm pheromone of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Nature* 241: 126-127.
- FALABELLA, P., TREMBLAY, E. & PENNACCHIO, F. 2000. Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97: 1-9.

- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- GÄRDENFORS, U. 1986. Taxonomic and biological revision of Palaearctic *Ephedrus* (Haliday) (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Entomologica Scandinavica Supplement* 27: 1-95.
- GÄRDENFORS, U. 1990. *Trioxys apterus* sp. n. from Ecuador, a new wingless species of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Systematics & Evolution* 21(1): 67-69.
- GOFF, A. M. & NAULT, L. R. 1974. Aphid cornicle secretions ineffective against attack by parasitoid wasps. *Environmental Entomology* 3: 565-566.
- GRIFFITHS, D. C. 1961. The development of *Monoctonus paludum* Marshall (Hym., Braconidae) in *Nasonovia ribis-nigri* on lettuce, and immunity reactions in other lettuce aphids. *Bulletin of Entomological Research* 52: 147-163.
- HÅGVAR, E. B. & HOFVANG, T. 1990. The aphid parasitoid *Ephedrus cerasicola*, a possible candidate for biological control in glasshouses? *SROP/WPRS Bulletin* XIII/5, 87-90.
- HÅGVAR, E. B. & HOFVANG, T. 1991. Aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae): biology, host selection and use in biological control. *Biocontrol News and Information* 12(1): 13-42.
- HINTON, H. E. 1954. Insect blood. *Science Progress* 168: 684-696.
- HÖLLER, C. 1991. Evidence for the existence of a species closely related to the cereal aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphi* DeStefani-Perez based on host ranges, morphological characters, isoelectric focusing banding patterns, cross-breeding experiments, and sex pheromone specificities (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Systematic Entomology* 16: 15-28.
- HOY, M. A. & SINGH, R. 2007. Tools for evaluating *Lipolexis oregmae* (Hymenoptera: Aphidiidae) in the field: Effects of host aphid and host plant on mummy location and color plus improved methods for obtaining adults. *Florida Entomologist* 90 (1): 214-222.

- HSIEH, C. Y. & ALLEN, W. W. 1986. Effects of insecticides on emergence, survival, longevity, and fecundity of the parasitoid *Diaretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae) from mummified *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 79: 1599-1602.
- HUFBAUER, R. A., BOGDANOWICZ, S. M., PERES, L. & HARRISON, R. G. 2001. Isolation and characterization of microsatellites in *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) and their applicability to related species. *Molecular Ecology Notes* 1: 197-199.
- HUGHES, R. D., WOOLCOCK, L. T., ROBERTS, J. A. & HUGHES, M. A. 1987. Biological control of the spotted alfalfa aphid, *Therioaphis trifolii* f. *maculata*, on lucerne crops in Australia, by the introduced parasitic hymenopteran *Trioxys complanatus*. *Journal of Applied Ecology* 24: 515-537.
- IVANOVIĆ, A & KALEZIĆ, M. 2012. Evolucionarna morfologija: teorijske postavke i geometrijska morfometrija. Biološki fakultet, Beograd.
- KAMBHAMPATI, S. & MACKAUER, M. 1988. Intra- and interspecific morphological variation in some *Aphidius* species (Hymenoptera: Aphidiidae) parasitic on the pea aphid in North America. *Annals of the Entomological Society of America* 81(6): 1010-1016.
- KAMBHAMPATI, S., VÖLKL, W. & 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.
- KAVALLIERATOS, N. G., LYKOURESSIS, D. P., SARLIS, G. P., STATHAS, G. J., SANCHIS SEGOVIA, A. & ATHANASSIOU, C. G. 2001. The Aphidiinae (Hymenoptera: Ichneumonoidea: Braconidae) of Greece. *Phytoparasitica* 29: 306-340.
- KAVALLIERATOS, N. G., TOMANOVIĆ, Ž., SARLIS, G. P., FASSEAS, C. & EMMANOUEL, N. E. 2006. A review of the genus *Aphidius* Nees in Greece (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) with the description of a new species. *Journal of Natural History* 40: 1179-1197.
- 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.
- KAVALLIERATOS, N. G., TOMANOVIĆ, Ž., STARÝ, P., ŽIKIĆ, V. & PETROVIĆ-OBRADOVIĆ, O. 2010: Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) attacking aphids feeding on Solanaceae and Cucurbitaceae crops in Southeastern Europe: Aphidiine-Aphid-Plant associations and key. *Annals of the Entomological Society of America* 103: 153-164.
- KENDALL, D. G. 1977. The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability* 9: 428-430.
- KLINGENBERG, C. P. & ZAKLAN, S. D. 2000. Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution*. 54(4): 1273-1285.
- KLINGENBERG, C. P. 2002. Morphometrics and the role of phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene* 287: 3-10.
- KLINGENBERG, C. P. 2011. MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357.
- KOS, K., PETROVIĆ, A., STARÝ, P., KAVALLIERATOS, N. G., IVANOVIĆ, A., TOŠEVSKI, I., JAKŠE, J., TRDAN, S. & TOMANOVIĆ, Ž. 2011. On the identity of cereal aphid parasitoid wasps *Aphidius uzbekistanicus*, *Aphidius rhopalosiphi*, and *Aphidius avenaphis* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) by examination of COI mitochondrial gene, geometric morphometrics, and morphology. *Annals of the Entomological Society of America* 104(6): 1221-1232.
- KRESPI, L., DEDRYVER, C. A., CREACH, V., RABASSE, J. M., LE RALEC, A. & NENON, J. P. 1997. Variability in the development of cereal aphid parasitoids and hyperparasitoids in oceanic regions as a response to climate and abundance of hosts. *Environmental Entomology* 26: 545-551.
- LANGER, A. & HANCE, T. 2000. Overwintering strategies and cold hardiness of two aphid parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Journal of Insect Physiology* 46: 671-676.

- LÁSKA, P. 1984. A method of comparing the role of aphid parasitoids and predators exemplified by the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 81: 81-89.
- LE RALEC, A. 1993. "Les Hyménoptères Parasitoïdes: Adaptations de l'Appareil Reproducteur Femelle. Morphologie et Ultrastructure de l'Ovarie, de l'Oeuf et de l'Ovopositeur" PhD thesis, Université de Rennes I.
- LENTEREN, J. C. v. & WOETS, J. 1988. Biological and Integrated Pest control in Greenhouses. *Annual Review of Entomology* 33: 239-269.
- LOPEZ, E. R. & VAN DRIESCHE, R. G. 1989. Direct measurement of host and parasitoid recruitment for assessment of total losses due to parasitism in continuously breeding species, the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 79: 47-59.
- MACKAUER, M. & KAMBHAMPATI, S. 1988. Sampling and rearing of aphid parasites. In: World crop pests. Aphids. Their biology, natural enemies and control. Vol B (A. K. Minks & P. Harrewijn, eds), pp. 205-216. Elsevier, Amsterdam.
- MACKAUER, M. & STARÝ, P. 1967. Hyménoptera. Ichneumonoidea. World Aphidiidae. In: Index of Entomophagous Insects (V. Delluchi & G. Remaudière, eds), pp. 1-195. Le Francois, Paris.
- MACKAUER, M. 1961a. Die Gattungen der Familie Aphidiidae und ihre verwandtschaftliche Zuordnung (Hyménoptera: Ichneumonoidea). *Beitraege zur Entomologie* 11: 792-803.
- MACKAUER, M. 1961b. Neue europäische Blattlaus-Schlupfwespen (Hyménoptera: Aphidiidae). *Bolletino del Laboratoria di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri' Portici* 19: 270-290.
- MACKAUER, M. 1961c. Die Typen der Unterfamilie Aphidiinae des Britischen Museums London (Hyménoptera: Braconidae). *Beiträge zur Entomologie* 11(1/2): 96-154.
- MACKAUER, M. 1965. Parasitological data as an aid in aphid classification. *The Canadian Entomologist* 97: 1016-1024.

- MACKAUER, M., MICHAUD, J. P. & VOLK, W. 1996. Host choice by aphidiid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae): host recognition, host quality, and host value. *The Canadian Entomologist* 128: 959-980.
- MARSHALL, 1896. Braconides. In: *Spécies des Hyménoptères d Europe et d Algérie*. Vol. 5 (E. André, ed), pp.527-618. Grey: Boufaut Frères.
- MAY, R. M. 1992. How many species inhabit the Earth? *Scientific American* 18-24.
- MCGREGOR, R. & MACKAUER, M. 1989. Toxicity of carbaryl to the pea-aphid parasite *Aphidius smithi*: influence of behaviour on pesticide uptake. *Crop Protection* 8: 193-196.
- MESCHELOFF, E. & ROSEN, D. 1990. Biosystematic studies on the Aphidiidae of Israel (Hymenoptera: Ichneumonoidea) 4. The Genera *Pauesia*, *Diaeretus*, *Aphidius*, and *Diaeretiella*. *Israel Journal of Entomology* 24: 51-91.
- MESSING, R. H. & ALINIAZEE, M. T. 1989. Introduction and establishment of *Trioxys pallidus* (Hymenoptera: Aphidiidae) in Oregon, U.S.A. for control of filbert aphid *Myzocalis coryli* (Homoptera: Aphididae). *Entomophaga* 34: 135-163.
- MICHAUD, J. P. & MACKAUER, M. 1995. The use of visual cues in host evaluation by aphidiid wasps. II. Comparison between *Ephedrus californicus*, *Monoctonus paulensis* and *Praon pequodorum*. *Entomologica Experimentalis et Applicata* 74: 267-275.
- MILNE, W. M. 1986. The establishment and dispersal of *Aphidius ervi* in bluegreen aphid populations in lucerne in New South Wales, Australia. In: *Ecology of Aphidophaga* (I. Hodek, ed), pp. 459-464. Academia, Prague.
- MILNE, W. M. 1988. Effectiveness of aphidophagous insects in lucerne. In: *Ecology and effectiveness of Aphidophaga* (E. Niemczyk & A. F. G. Dixon, eds), pp 203-210. SPB Academic Publishing, The Hague.
- MITROVSKI-BOGDANOVIĆ, A., PETROVIĆ, A., MITROVIĆ, M., IVANOVIĆ, A., ŽIKIĆ, V., STARÝ, P., VORBURGER, C. & TOMANOVIĆ, Ž. 2013: Identification of two cryptic species within the *Praon abjectum* group (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) using molecular markers and geometric morphometrics. *Annals of the Entomological Society of America* 106: 170-180.

- MUTANEN, M. & PRETORIUS, E. 2007. Subjective visual evaluation vs. traditional morphometric and geometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology* 32: 371-386.
- NEMEC, V & STARÝ, P. 1984. Population diversity of *Diaretiella rapae* (M'Int.) (Hym., Aphidiidae), an aphid parasitoid in agroecosystems. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* 97: 223-233.
- NIET, T. van der, ZOLLIKOFER, C. P. E., PONCE, D. E., LEON, M. S., JOHNSON, S. D. & LINDER, H. P. 2010. Three-dimensional geometric morphometrics for studying floral shape variation. *Trends in Plant Science* 15: 423–426.
- O'DONNELL, D. J. 1989. A morphological and taxonomic study of first instar larvae of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Systematic Entomology* 14: 197-219.
- OLIVER, K. M., RUSSELL, J. A., MORAN, N. A. & HUNTER, M. S. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 100: 1803-1807.
- PENNACCHIO, F. 1989. The Italian species of the genus *Aphidius* Nees (Hymenoptera: Braconidae:Aphidiinae). *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri'* 46: 75-106.
- PETROVIĆ, A. 2011. Genetička i morfološka varijabilnost parazitskih osa *Aphidius urticae* s. str. grupe (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd*.
- PETROVIĆ-OBRAĐOVIĆ, O. 2003. Biljne vaši (Homoptera: Aphididae) Srbije. *Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu*. 1-153.
- PIKE, K. S., STARÝ, P., MILLER, T., GRAF, G., ALLISON, D., BOYDSTON, L. & MILLER, R. 2000. Aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Northwest USA. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 102 (3): 688-740.
- POLGÁR, L. A. & HARDIE, J. 2000. Diapause induction in aphid parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97: 21-27.
- POLGÁR, L. A., MACKAUER, M. & VOLKL, W. 1991. Diapause induction in two species of aphid parasitoids: influence of aphid morph. *Journal of Insect Physiology* 37: 699-702.

- PRETORIUS, E. 2005. Using geometric morphometrics to investigate wing dimorphism in male and females of Hymenoptera – a case study based on the genus *Tachysphex* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae: Larrinae). *Australian Journal of Entomology* 44: 113-121.
- PUNGERL, N. B. 1983. Variability in characters commonly used to distinguish *Aphidius* species (Hymenoptera: Aphidiidae). *Systematic Entomology* 8: 425-430.
- PUNGERL, N. B. 1984. Host preference of *Aphidius* (Hymenoptera: Aphidiidae) populations parasitising pea and cereal aphids (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 74: 153-161.
- PUNGERL, N. B. 1986. Morphometric and electrophoretic study of *Aphidius* species (Hymenoptera, Aphidiidae) reared from a variety aphid hosts. *Systematic Entomology* 11: 327-354.
- QUICKE, D. L. J. & VAN ACHTERBERG, C. 1990. Phylogeny of the subfamilies of Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Zoologische Verhandelingen* 258: 1-95.
- QUICKE, D. L. J., & BELSHAW, R. 1999. Incongruence between morphological data sets: an example from the evolution of endoparasitism among parasitic wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Systematic Biology* 48: 436-454.
- RAKSHANI, E., TALEBI, A. A., STARÝ, P., TOMANOVIĆ, Ž. & MANZARI, S. 2007. Aphid parasitoid (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) associations on willows and poplars in Iran. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 53(3): 281-292.
- RAKSHANI, E., TALEBI, A. A., STARÝ, P., TOMANOVIĆ, Ž., KAVALLIERATOS, N. G. & MANZARI, S. 2008. A review of *Aphidius* Nees (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Iran: host associations, distribution and taxonomic notes. *Zootaxa* 1767: 37-54.
- ROHLF, F. J. & MARCUS, L. F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution* 8: 129-132.
- ROHLF, F. J. & SLICE, D. 1990. Extension of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39: 40-59.

- ROHLF, F. J. 1990. Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21: 299-316.
- 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., GONZALEZ-CANDELAS, F. & MICHELENA, J. M. 2000. An 18S rDNA based molecular phylogeny of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2: 180-194.
- SANCHIS, A., MICHELENA, J. M., LATORRE, A., QUICKE, D. L. J., GÄRDENFORS, U. & BELSHAW, R. 2001. The phylogenetic analyses of variable-length sequence data: Elongation factor-1 α introns in European populations of the parasitoid wasp genus *Pauesia* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Molecular Biology and Evolution* 18: 1117-1131.
- SANDROCK, C., SCHIRRMESTER, B. & VORBURGER, C. 2011. Evolution of reproductive mode variation and host associations in a sexual-asexual complex of aphid parasitoids. *BMC Evolutionary Biology* 11: 348.
- SCHLINGER, E. I. & HALL, J. C. 1960. The biology, behavior and morphology of *Praon palitans* Muesebeck, an internal parasite of the spotted alfalfa aphid, *Therioaphis maculata* (Buckton) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Annals of the Entomological Society of America* 53: 144-160.
- SHARKEY, M. J. 1993. Family Braconidae. In: Hymenoptera of the world, an identification guide to families (H. Goulet and J. Huber, eds.), pp. 362-394. *Agriculture Canada Research Branch Monograph* 1894E: pp 668.
- SHAW, M. R. & HUDDLESTON, T. 1991. Classification and biology of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Royal Entomological Society Of London* 7(11): 1-126.
- SHEEHAN, W. & SHELTON, A. M. 1989. Parasitoid response to concentration of herbivore food plants: finding and leaving plants. *Ecology* 70: 993-998.
- SHEETS, H. D. 2000. Integrated Morphometrics Package (IMP). <http://www2.canisius.edu/~sheets/>

- SHI, M. & CHEN, X. 2005. Molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) based on DNA sequences of 16S rRNA, 18S rDNA and ATPase 6 genes. *European Journal of Entomology* 102: 133-138.
- SHIPUNOV, A. B. & BATEMAN, R. M. 2005. Geometric morphometrics as a tool for understanding *Dactylorhiza* (Orchidaceae) diversity in European Russia. *Biological Journal of the Linnean Society* 85(1): 1-12.
- SHORT, J. R. T. 1952. The morphology of the head of larval Hymenoptera with special reference to the head of Ichneumonoidea, including a classification of the final instar larvae of the Braconidae. *Transaction of the Royal Entomological Society of London* 103: 27-84.
- SHUKSHUK, A. H. 2012. Morfološka i genetička karakterizacija *Aphidius colemani* kompleksa vrsta (Hymenoptera, Braconidae). *Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.*
- SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H. & FLOOK, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.
- SIRVASTAVA, M. & SINGH, R. 1988. Bionomics of *Trioxys indicus*, an Aphidiid Parasitoid of *Aphis craccivora*. 26. Impact of Host Extract on the Oviposition Response of the Parasitoid. *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems* 5(2).
- SMITH, C.F. 1944. The Aphidiinae of North America (Braconidae: Hymenoptera). *Contributions in Zoology and Entomology, The Ohio State University, Columbus, USA* 6:1-154.
- SMITH, P. & KAMBHAMPATI, S. 2000. Evolutionary transitions in Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). In: *Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control* (A. D. Austin & M. Dowton, eds), pp. 106-113. Collingwood, Victoria: CSIRO.
- SMITH, P., KAMBHAMPATI, S., VÖLKL, W. & MACKAUER, M. 1999. A phylogeny of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) inferred from mitochondrial NADH 1 dehydrogenase gene sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 236-245.

- STANKOVIĆ. S., PETROVIĆ, A., ILIĆ MILOŠEVIĆ, M., STARÝ, P., KAVALLIERATIOS, N. & ŽIKIĆ, V. 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(1):165–174.
- STARÝ, P. 1966. Aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) and their relationship to aphid attending ants, with respect to biological control. *Insectes sociaux* 3(8): 185-202.
- STARÝ, P. 1974. Parasite spectrum (Hymenoptera: Aphidiidae) of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulz.) (Homoptera: Aphididae). *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri'* 31: 61-98.
- STARÝ, P. & HAVELKA, J. 2008. Fauna and associations of aphid parasitoids in an updated farmland area (Czech Republic). *Bulletin of Insectology* 61: 251-276.
- STARÝ, P. & STECHMANN, D. H. 1990. *Ephedrus cerasicola* Starý (Hym., Aphidiidae), a new biocontrol agent of the banana aphid, *Pentalonia nigronervosa* Coq. (Hom., Aphididae). *Journal of Applied Entomology* 109: 457-462.
- STARÝ, P. 1970. Biology of aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) with respect to integrated control. *Series Entomologica* 6, W. Junk, The Hague, pp643.
- STARÝ, P. 1972. Host life-cycle and adaptation of parasites of *Periphyllus*-aphids (Homoptera, Chaitophoridae; Hymenoptera, Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 69: 89-96.
- STARÝ, P. 1973. A review of the *Aphidius* species (Hymenoptera: Aphidiidae) of Europe. *Annotationes zoologicae et botanicae, Bratislava* 84: 1-85.
- STARÝ, P. 1975. Parasites (Hymenoptera, Aphidiidae) of leaf-curling apple aphids in Czechoslovakia. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 72: 99-104.
- STARÝ, P. 1975. The subgeneric classification of *Lysiphlebus* Förster, 1862 (Hymenoptera, Aphidiidae). *Annotationes Zoologicae et Botanicae* 1-9.

- STARÝ, P. 1976. Biology of *Areopraon lepelleyi* Waterston, a parasite of some Eriosomatid aphids (Hymenoptera: Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 73: 312-317.
- STARÝ, P. 1981. On the strategy, tactics and trends of the host specificity evolution in aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 78: 56-75.
- STARÝ, P. 1988a. Aphidiidae. In: Aphids, their biology, Natural enemies and Control (A. K. Minks & P. Harrewijn, eds). *Elsevier, Amsterdam* 2B: 171-184.
- STARÝ, P. 1988b. The emergence hole of aphid parasites (Hymenoptera, Aphidiidae) its significance in a natural system. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 71: 209-216.
- STARÝ, P., LYON, J. R. & LECLANT, F. 1988. Biocontrol of aphids by the introduced *Lysiphlebus testaceipes* (Cress.) (Hym., Aphidiidae) in Mediterranean France. *Journal of Applied Entomology* 105: 74-87.
- STARÝ, P., REMAUDIÈRE, G. & LECLANT, F. 1973. Nouvelles données sur les Aphidiides de France (Hym.). *Annales de la Société Entomologique de France* 9(2): 309-329.
- StatSoft, Inc. 2004. STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.
- STRONG, F. E. 1967. Observations on aphid cornicle secretions. *Annals of the Entomological Society of America* 60: 668-673.
- TAKADA, H. & SHIGA, M. 1974. Description of a new species and notes on the systematic position of the genus *Aclitus* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Kontyu* 42: 283-292.
- TALEBI, A. A., RAKHSHANI, E., FATHIPOUR, Y., STARÝ, P., TOMANOVIĆ, Ž. & RAJABI-MAZHAR, N. 2009. Aphids and their parasitoids (Hym., Braconidae: Aphidiinae) associated with medicinal plants in Iran. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3 (2): 205-219.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28: 2731-2739.

- TOMANOVIĆ, Ž. & KAVALLIERATOS, N. G. 2002. *Trioxys* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Serbia and Montenegro. *Acta entomologica serbica* 7(1/2): 67-81.
- TOMANOVIĆ, Ž. & KAVALLIERATOS, N. G. 2002. Two new aphidiine wasps (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) from southeastern Europe. *Reichenbachia* 34: 341-345.
- TOMANOVIĆ, Ž., & STARÝ, P. 2001. *Aphidius linosiphonis* sp. nov. (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae), a new member of the aphid parasitoid guild associated with Galium. *Zootaxa* 6:1-4.
- TOMANOVIĆ, Ž., BRAJKOVIĆ, M. & KRUNIĆ, M. 1999. Numerical discrimination of some *Aphidius* species (Aphidiidae, Hymenoptera) from Yugoslavia. *Archives of Biological Science* 51: 209-218.
- TOMANOVIĆ, Ž., KAVALLIERATOS, N. G., ATHANASSIOU, C. G., PETROVIĆ, O. & STANISAVLJEVIĆ, L. Ž. 2004. A new *Aphidius* species (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) from high-montane areas of southeastern Europe. *Phytoparasitica* 32: 221-225.
- TOMANOVIĆ, Z., KAVALLIERATOS, N. G., STARÝ, P., ATHANASSIOU, C. G., ŽIKIĆ, V., PETROVIĆ-OBRAĐOVIĆ, O. & SARLIS, G. P. 2003. *Aphidius* Nees aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) in Serbia and Montenegro: tritrophic associations and key. *Acta entomologica serbica* 8(1/2): 15-39.
- TOMANOVIĆ, Ž., KAVALLIERATOS, N. G., STARÝ, P., PETROVIĆ-OBRAĐOVIĆ, O., TOMANOVIĆ, S. & JOVANOVIĆ, S. 2006. Aphids and parasitoids on willows and poplars in southeastern Europe (Homoptera: Aphidoidea; Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae). *Journal of Plant Diseases and Protection* 113 (4): 174-180.
- TOMANOVIĆ, Ž., KAVALLIERATOS, N. G., STARÝ, P., ŽIKIĆ, V., TOMIĆ, V. T. & LUČIĆ, L. R. 2007. Redescription of two species of Aphidiinae (Hymenoptera : Braconidae) from high mountain areas of south-eastern Europe, with biological and biogeographical notes on co-occurring guild members. *Entomologica fennica* 18: 36-45.

- TOMANOVIĆ, Ž., KOS, K., PETROVIĆ, A., STARÝ, P., KAVALLIERATOS, N. G., ŽIKIĆ, V., JAKŠE, J., TRDAN, S. & IVANOVIĆ, A. 2013: The relationship between molecular variation and variation in the wing shape of three aphid parasitoid species: *Aphidius uzbekistanicus* Luzhetzki, *Aphidius rhopalosiphi* De Stefani Perez and *Aphidius avenaphis* (Fitch) (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Zoologischer Anzeiger* 252: 41-47.
- TREMBLAY, E. & CALVERT, D. 1971. Embryosystematics in the aphidiines (Hymenoptera: Braconidae). *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri'* 29: 223-249.
- TREMBLAY, E. 1984. The parasitoid complex (Hym.: Ichneumonidea) of *Toxoptera aurantii* (Hom.: Aphidoidea) in the Mediterranean area. *Entomophaga* 29: 203-209.
- UNRUH, T. R., WHITE, W., GONZALES, D. & WOOLEY, J. B. 1989. Genetic relationships among seventeen *Aphidius* (Hymenoptera: Aphidiidae) populations, including six species. *Annals of the Entomological Society of America* 82: 754-768.
- VAN SHELDT, J. DOUMA, J. B. & RAVENSBERG, W. J. 1990. Recent developments in the control of aphids in sweet pepper and cucumbers. *SROP/WPRS Bulletin* VIII/5: 190-193.
- VAUGHN, T. T. & ANTOLIN, M. F. 1998. Population genetics of an opportunistic parasitoid in an agricultural landscape. *Heredity* 80: 152-162.
- VINSON, S. B. 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology* 21: 109-133.
- VINSON, S. B. 1984. Parasitoid-host relationship. In: *Chemical Ecology of Insects* (W. J. Bell & R. T. Cardé, eds), pp. 205-233. Chapman and Hall, London.
- VISCOSI, V. & CARDINI, A. 2011. 'Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners'. *PLOS ONE*, 6, 10, pp. 1 – 20.
- VISCOSI, V., FORTINI, P., SLICE, D. E., LOY, A. & BLASI, C. 2009. Geometric morphometric analyses of leaf variation in four oak species of subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Plant Biosystems* 143(3): 575–587.

- VOLKL, W. & MACKAUER, M. 1996. „Sacking“ the host: oviposition behaviour of a parasitoid wasp, *Dyscritulus planiceps* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Journal of Insect Behavior* 9: 975-980.
- VÖLKL, W. & MACKAUER, M. 2000. Oviposition behaviour of aphidiine wasps (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae): morphological adaptations and evolutionary trends. *The Canadian Entomologist* 132: 197-212.
- VÖLKL, W. & STADLER, B. 1991. Interspecific larval competition between *Lysiphlebus testaceipes* and *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Journal of Applied Entomology* 111(1): 63-71.
- VORBURGER, C., SANDROCK, C., GOUSKOV, A., CASTANEDA, L. E. & FERRARI, J. 2009. Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host-parasitoid interaction. *Evolution* 63: 1439-1450.
- WHARTON, R. A., SHAW, S. R., SHARKEY, M. J., WAHL, D. B., WOOLLEY, J. B., WHITFIELD, J. B., MARSH, P. M. & JOHNSON, J. W. 1992. Phylogeny of the subfamilies of the family Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea): a reassessment. *Cladistics* 8: 199-235.
- WHITFIELD, J. B. 1992. The polyphyletic origin of endoparasitism in the cyclostome lineages of Braconidae (Hymenoptera). *Systematic Entomology* 17: 273-286.
- WRATTEN, S. D. & POWELL, W. 1991. Cereal aphids and their natural enemies. In: *The ecology of temperate cereal fields* (L. G. Firbank, N. Carter, J. F. Darbyshire & G. R. Potts, eds), pp. 233-59. Blackwell, Oxford.
- YU, D. S., ACHTERBERG, C. v. & HORSTMANN, K. 2013. World Ichneumonoidea 2011. Taxonomy, Biology, Morphology and Distribution. Taxapad (Scientific Names for Information Management), Interactive Catalogue, Ottawa. Available on: www.taxapad.com
- ZELDITCH, M. L., SWIDERSKI, D. L., SHEETS, H. D. & FINK, W. L. 2004. Geometric morphometrics for biologists: A primer. *Elsevier Academic Press* 1-443.
- ŽIKIĆ, V. 2008. Morfološka studija parazitskih osa kompleksa *Ephedrus persicae* Froggat 1904 (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.*

- ŽIKIĆ, V., ILIĆ-MILOŠEVIĆ, M., STANKOVIĆ, S. S., PETROVIĆ, A., PETROVIĆ-OBRADOVIĆ, O., KAVALLIERATOS, N., STARÝ, P. & TOMANOVIĆ, Ž. 2012. Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) of Serbia and Montenegro – tritrophic interactions. *Acta Entomologica Serbica* 17: 83-105.
- ŽIKIĆ, V., STANKOVIĆ, S. S., ILIĆ, M. & KAVALLIERATOS, N. 2013. Braconid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) on poplars and aspen (*Populus* spp.) in Serbia and Montenegro. *North-Western Journal of Zoology* 9(2): 264-275.
- ŽIKIĆ, V., TOMANOVIĆ, Ž., IVANOVIĆ, A., KAVALLIERTOS, N. G., STARÝ, P., STANISAVLJEVIĆ, LJ. Ž. & RAKHSHANI, E. 2009. Morphological characterization of *Ephedrus persicae* Biotypes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in the Palearctic. *Annals of the Entomological Society of America* 102(1): 1-11.

BIOGRAFIJA AUTORA

Kandidat Marijana M. Ilić Milošević je rođena 01.01.1983. godine u Prištini. Osnovnu školu je završila u Prištini. Nakon završene srednje škole (Gimnazije) u Nišu, 2001. godine upisuje Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Nišu, gde je završila studije na Departmanu za biologiju i ekologiju. Diplomirala je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9.35, a diplomski rad pod nazivom „Nitrofilna vegetacija klase *Bidentetea tripartitae* u Srbiji“ je odbranila sa najvišom ocenom 10.

Nakon diplomiranja upisuje doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, gde studira na smeru Morfologija, sistematika i filogenija životinja. Učestvuje u naučnim projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, kao i u međunarodnom naučnom projektu FP7 (BIOCOMES).

U periodu 2008-2010 radi kao saradnik u nastavi, a zatim se zapošljava na mesto asistenta za užu naučnu oblast Zoologija na Departmanu za biologiju i ekologiju na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu.

Član je Entomološkog društva Srbije.

Govori i piše engleski jezik, a služi se i francuskim jezikom u stručnoj literaturi.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Маријана М. Илић Милошевић _____

број индекса _____ Б 3109/2009 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Таксономски статус родова и врста *Euaphidius* Maskauer и *Remaudierea* Starý (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) на основу морфолошких и молекуларних анализа 28S рРНК и COI гена

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.04.2015. године _____



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Маријана М. Илић Милошевић

Број индекса Б 3109/2009

Студијски програм Морфологија, систематика и филогенија животиња

Наслов рада **Таксономски статус родова и врста *Euaphidius* Maskauer и *Remaudierea* Starý (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) на основу морфолошких и молекуларних анализа 28S рРНК и COI гена**

Ментор др Владимир Жикић и др Жељко Томановић

Потписани/а Маријана М. Илић Милошевић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.04.2015. године



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Таксономски статус родова и врста *Euaphidius* Mackauer и *Remaudierea* Starý (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) на основу морфолошких и молекуларних анализа 28S рРНК и COI гена

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.04.2015. године



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

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

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

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

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

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