

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Saša S. Stanković

**FILOGENETSKI ODNOSI RODOVA
SUBTRIBUSA LYSIPHLEBINA I
TAKSONOMSKI STATUS VRSTA RODA
ADIALYTUS (FOERSTER) (HYMENOPTERA,
BRACONIDAE, APHIDIINAE)**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Saša S. Stanković

**PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG
GENERA OF THE SUBTRIBE LYSIPHLEBINA
AND TAXONOMIC STATUS OF
ADIALYTUS (FOERSTER) SPECIES
(HYMENOPTERA, BRACONIDAE,
APHIDIINAE)**

doctoral dissertation

Belgrade, 2015

Mentor:

Dr Vladimir Žikić, vanredni profesor

Univerzitet u Nišu,

Prirodno-matematički fakultet, Departman za
biologiju i ekologiju

Mentor:

Dr Anđeljko Petrović, docent

Univerzitet u Beogradu,

Biološki fakultet

Član komisije:

Dr Željko Tomanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu,

Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Veliki je broj ljudi koji su zaslužni da ovaj rad bude napisan i da baš meni pripadne čast da im se na ovom mestu iskreno zahvalim.

Pre svega, zahvaljujem se svom mentoru dr Vladimiru Žikiću, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Prava je retkost i zadovoljstvo imati ovako izvanrednog mentora, koji je aktivno učestvovao u svim segmentima izrade ove disertacije. Još veće su zasluge za uvođenje u neverovatan svet parazitskih osa i same problematike koja prati ovu veliku grupu insekata. Pored stručne pomoći i znanja, koje je prof. Žikić nesebično delio, zahvalan sam i na svakoj drugoj vrsti pomoći kojih je bilo mnogo.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Anđeljku Petroviću, docentu Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Ovo je bio primer komplementarnog mentorstva i pružanja znanja, naročito u sferi molekularne sistematike. Zahvaljujem se na strpljenju koje je imao tokom mog rada u laboratoriji kao i na svom znanju i tehnikama u bavljenju DNK molekulima.

Profesoru Željku Tomanoviću se posebno zahvaljujem na svom znanju koje mi je pružio o parazitoidima i svim korisnim sugestijama tokom izrade ove disertacije. Profesor Tomanović je suštinski bio i mentor koji je takođe učestvovao u svim segmentima izrade ovog rada kao i proučavanju afidiina uopšte.

Zahvaljujem se dr Ani Ivanović, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na ogromnoj pomoći i korisnim savetima u vezi sa geometrijskom morfometrijom.

Veliku pomoć u identifikaciji biljnih vaši je pružila dr Olivera Petrović-Obradović, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, te se ovom prilikom iskreno zahvaljujem na tome.

Koleginicama Marijani Ilić Milošević i Jelisaveti Čkrkić se zahvaljujem na velikoj pomoći tokom izrade disertacije kao i na pomoći u laboratorijskom radu.

Veliki deo materijala koji je korišćen u izradi ovog rada su ustupili: dr Ehsan Rakhshani, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Zabol, Iran; dr Petr Starý, Institute of Entomology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic; dr Nickolas G. Kavallieratos, Laboratory of Agricultural Entomology, Department of Entomology and Agricultural Zoology, Benaki Phytopathological Institute, Attica, Greece; dr Milana Mitrović, naučni saradnik Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, Srbija. Takođe im se zahvaljujem na pomoći u prikupljanju stručne literature.

Koristim priliku da se zahvalim svim svojim prijateljima i kolegama sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, koji su dali svoj doprinos i pomogli na razne načine.

Zahvaljujem se Teodori, Nikoliji i Nikoli Marjanović koji su bili uvek spremni da pomognu u terenskom radu i da prihvate nova saznanja o insektima i biologije uopšte.

Porodica mi je bila glavni oslonac i pružila najveću moralnu podršku. Ovom prilikom želim da se najtoplije zahvalim svojoj supruzi Jasmini i sinu Filipu kome i posvećujem ovaj rad.

Na kraju, ali ništa manje, želim da se zahvalim svojim roditeljima koji su mi pomagali tokom celog školovanja i usmerili na pravi put. Beskrajno vam hvala.

Autor

Filogenetski odnosi rodova subtribusa *Lysiphlebina* i taksonomski status vrsta roda *Adialytus* (Foerster) (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)

Rezime

Rod *Adialytus* predstavlja jedan od tri roda subtribusa *Lysiphlebina*. Pored ovog, ovde spadaju rodovi *Lysiphlebus* i *Lysiphlebia*. Ukupno je opisano sedam vrsta roda *Adialytus*, koje su rasprostranjene širom Palearktika. *Adialytus* je dugo bio razmatran kao podrod u okviru roda *Lysiphlebus*, sa kojim deli mnoge morfološke karaktere. Pored nerazjašnjenog statusa ovog roda, postoje velike poteškoće pri identifikaciji vrsta u okviru samog roda *Adialytus*. U ovom radu su analizirane tri najčešće evropske vrste: *Adialytus ambiguus*, *A. salicaphis* i *A. thelaxis*. Ukupno je analizirano 228 jedinki, pri čemu analiza obuhvata isključivo ženke. Korišćene su tri metode za morfološku i genetičku karakterizaciju vrsta roda *Adialytus*. Metodom „tradicionalne“ morfometrije su analizirani meristički i kontinuirani karakteri, pri čemu su kontinuirani karakteri predstavljeni kao dužinski odnosi. Metoda geometrijske morfometrije je korišćena za ispitivanje obrasca varijabilnosti oblika prednjih krila. Molekularne analize su sprovedene korišćenjem mitohondrijalnog gena za citohrom oksidazu 1 (mtCOI) i gena za veliku ribozomalnu subjedinicu 28S (28S rRNK). Upotrebom „tradicionalne“ morfometrije utvrđena je statistički značajna varijabilnost između tri analizirane vrste roda *Adialytus*. Najveću varijabilnost su pokazali karakteri kao što je broj mirisnih brazdi na prvom, drugom i petom flagelarnom članku antena. Takođe, značajne razlike su uočene i u samim proporcijama analiziranih flagelarnih članaka. Geometrijskom morfometrijom detektovane su izvesne razlike u obliku prednjih krila. Distalni deo krila ima znatno veću varijabilnost u odnosu na proksimalni. Jedinke *A. ambiguus* imaju relativno uska krila i dugačak metakarpus, za razliku od *A. salicaphis* i *A. thelaxis*. Molekularnom analizom na osnovu mtCOI gena potvrđeno je da je *A. thelaxis* „dobra“ vrsta. Genetičke razlike između *A. ambiguus* i *A. salicaphis* su relativno male i na

graničnim vrednostima za specijsko razdvajanje. Vrste *A. ambiguus* i *A. salicaphis* su veoma bliske, kako na morfološkom, tako i na genetičkom nivou. Međutim, one se ipak dosta razlikuju u ekološkom pogledu. Analiza na generičkom nivou u okviru subtribusa Lysiphlebina korišćenjem ribozomalnog gena za 28S rRNK je pokazala da se rod *Lysiphlebia* izdvaja sa visokom podrškom od zajedničke klade koju čine rodovi *Adialytus* i *Lysiphlebus*. Međutim poslednja dva roda su veoma bliska i razdvajanje nije jasno definisano.

Ključne reči: *Adialytus*, Lysiphlebina, geometrijska morfometrija, mtCOI gen, 28S rRNK gen, parazitoidi.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Morfologija, sistematika i filogenija životinja

UDK broj: [595.79:591.557.8]:595.752(043.3)

Phylogenetic relationships among genera of the subtribe Lysiphlebina and taxonomic status of *Adialytus* (Foerster) species (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)

Summary

The genus *Adialytus* is a member of the subtribe Lysiphlebina. Beside this genus the subtribe encompasses two more genera: *Lysiphlebus* and *Lysiphlebia*. So far, seven valid *Adialytus* species have been recognized which can be found throughout the Palaearctic. The genus *Adialytus* was previously considered as a subgenus within the genus *Lysiphlebus*, which it resembles to. Beside the unclear status of this genus, there are many difficulties concerning identification of *Adialytus* species. In this work, three most common European species were analyzed: *Adialytus ambiguus*, *A. salicaphis* and *A. thelaxis*. In total, 228 specimens were included into analysis, all being females. Three methods were involved into morphological and genetic characterization of the *Adialytus* species. Traditional morphometrics is used for the analysis of meristic and continuous characters. However, continuous characters were represented as a relation of lengths and widths. Geometric morphometrics is used in forewing shape analysis. For the molecular analysis on the species level, the mitochondrial gene for cytochrome oxidase 1 is used (mtCOI), while for the relation among the genera of the subtribe Lysiphlebina, the ribosomal gene 28S (28SrRNA) is used. According to the traditional morphometrics a statistically significant variability is detected among the all three *Adialytus* species. The greatest variability is detected in the number of olfactory grooves (rhinaria) on the first, second and fifth flagellar segment of antenna. Furthermore, significant differences are detected in the proportions of the very segments. The differences in the forewing shape are detected by the geometric morphometrics method. The distal part of the forewing is much more variable than proximal. The species *A. ambiguus* has relatively

narrow forewings and long metacarpus in contrast to *A. salicaphis* and *A. thelaxis*. According to the molecular analysis of the mtCOI gene, it was confirmed that *A. thelaxis* is “bona species”. The genetic differences between *A. ambiguus* and *A. salicaphis* are relatively small and on the margin for species delimitation. Although very close, both genetically and morphologically, *A. ambiguus* and *A. salicaphis* the two species are nevertheless ecologically different, i.e. they occupy different ecological niches. The analysis on the generic level of the subtribe Lysiphlebina by using the 28S rRNK gene showed that the genus *Lysiphlebia* is clearly delimited from the other two genus with great support. However, relations between the genera *Adialytus* and *Lysiphlebus* are not so clear and the two genera are very closely related.

Key words: *Adialytus*, Lysiphlebina, Geometric morphometrics, mtCOI gene, 28S rRNK gene, parasitoids.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Morphology, systematics and phylogeny of animals

UDK number: [595.79:591.557.8]:595.752(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Morfologija i opšte karakteristike familije Braconidae	1
1.2. Filogenija brakonida i pozicija potfamilije Aphidiinae	3
1.3. Pregled dosadašnjih istraživanja brakonida u Srbiji.....	6
1.4. Biologija i ekologija afidiina (ekonomski značaj)	7
1.5. Podtribus Lysiphlebina	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. „Tradicionalna“ morfometrija	23
3.2. Geometrijska morfometrija	28
3.3. Molekularne analize	30
4. REZULTATI	37
4.1. „Tradicionalna“ morfometrija	37
4.2. Geometrijska morfometrija	49
4.3. Molekularne analize	55
4.3.1. Analiza sekvenci mtCOI gena i filogenetska rekonstrukcija.....	56
4.3.2. Analiza sekvenci gena za 28S rRNK i filogenetska rekonstrukcija.....	63
5. DISKUSIJA	71
6. ZAKLJUČCI	80
7. LITERATURA	82

1. UVOD

1.1. Morfologija i opšte karakteristike familije Braconidae

Familija Braconidae, poznata i kao ose najeznice, pripada redu opnokrilaca (Hymenoptera). Njima srodna familija su ose potajnice iz familije Ichneumonidae koje se zajedno sa brakonidama svrstavaju u nadfamiliju Ichneumonoidea. Brakonide predstavljaju veliku familiju, prema dosadašnjim istraživanjima opisano je preko 17 500 vrsta (Yu et al., 2012). Najveći broj vrsta je opisan iz Holarktičke i Australijske oblasti, međutim pretpostavlja se da je tropski region znatno bogatiji vrstama ali nedovoljno istražen. Procene brojnosti ove familije se kreću najčešće od 30 000 pa do 50 000 vrsta (Dolphin i Quicke, 2001; Marsh, 1979). Familija Braconidae obuhvata više potfamilija, međutim ne postoji slaganje oko njihovog tačnog broja. Prema klasifikaciji koju su dali Quicke i van Achterberg (1990) familija Braconidae obuhvata 46 potfamilija, dok prema Sharkey (1993) familija obuhvata svega 29 potfamilija. U evropskoj fauni je poznato oko 3500 vrsta koje su svrstane u 36 potfamilija (Achterberg, 2013).

Brakonide su relativno sitne ose, veličina tela se kreće najčešće od dva do šest milimetara, mada neke tropske vrste mogu biti znatno veće. Glava je uglavnom kockasta, a prema položaju usnog aparata ortognatnog tipa. Pored dva složena oka, na temenu imaju i tri ocele. Na glavi se nalazi par končastih ili čekinjastih antena. Broj i oblik članaka u antenama predstavlja važan taksonomski karakter na nivou rodova i vrsta. Kod većine vrsta mužjaci imaju nešto veći broj članaka u antenama. Usni aparat je prilagođen za uzimanje tečne hrane, uglavnom nektara. Neki delovi usnog aparata su takođe bitni pri identifikaciji (Brajković, 1989b; Shaw i Huddleston, 1991).

U sastav grudnog dela brakonida pored protoraksa, mezotoraksa i metatoraksa, ulazi i prvi abdominalni segment – propodeum, pa se zbog toga grudi brakonida kao i svih apokritnih osa označavaju kao mezozoma. Sve brakonide imaju dobro razvijene noge. Najveći broj vrsta ima dobro razvijena dva para krila, međutim, neke vrste imaju redukovana krila, ili su apterne (*Lodbrokia*, *Pseudopezomachus*, *Aclitus*, neke vrste roda *Trioxys*) (Belokobylskij i Kula, 2012). Ponekad postoji polni dimorfizam, tako da

mužjaci mogu imati stigmum i na zadnjim krilima, npr. vrste roda *Dendrosoter*. Krilna nervatura je generalno redukovana, a najveće tendencije redukcije poznate su kod potfamilija Aphidiinae i Euphorinae. Postoje četiri glavna uzdužna nerva na prednjim krilima: kostalni, subkostalni, mediokubitalni i analni i nekoliko poprečnih. Kostalni i subkostalni nerv srastaju, a zadebljanje na sredini ova dva nerva predstavlja stigmum.

Abdomen, odnosno metazoma, počinje manje ili više izduženim petiolusom koji predstavlja drugi embrionalni segment trbušnog regiona, međutim kod adulta on predstavlja prvi segment metazome. Drugi i treći abdominalni segment su kod većine brakonida nepokretno srasli. Kod nekih grupa abdominalni tergiti su srasli i čine karapaks. Ova osobina je najizraženija kod potfamilije Cheloninae mada se sreće i kod roda *Triaspis* (Brachistinae). Polni aparat ženki vodi poreklo od VIII i IX abdominalnog segmenta. Legalica je građena od tri para ploča i valvi, kao i od sistema mišića i žlezda (Scudder, 1961). Dužina legalice je varijabilna, prilagođena za paralizovanje i polaganje jaja u ili na domaćina (Shaw i Huddleston, 1991). Polni aparat mužjaka je generalno sličan kao i kod ostalih grupa opnokrilaca. Genitalije mužjaka nastaju od parnih falusnih lobusa koji se začinju na kraju IX ili između IX i X abdominalnog segmenta (Matsuda, 1958; Snodgrass, 1941).

Stadijum imaga familije Braconidae je slobodnoživeći. Najveći deo života provode u potrazi za domaćinom i hranom. Skoro sve vrste su parazitoidi insekata iz različitih redova. Samo nekoliko vrsta su fitofagne, a najpoznatije su iz roda *Allorhogas* (Doryctinae) koje se hrane semenima biljaka iz familije Fabaceae (Marsh, 1991). Nakon polaganja jaja, u telu domaćina se razvijaju larve koje se hrane unutrašnjim organima domaćina što na kraju dovodi do njegove smrti (Askew, 1971). U zavisnosti od toga da li ženke polažu jaja na ili u domaćina, kao i od samog ponašanja larvi pri parazitiranju, brakonide se tradicionalno dele na ektoparazitske i endoparazitske. Međutim, u novijoj literaturi usvojena je podela parazitoida na idiobionte i koinbionte. Kod koinobiontske grupe domaćin nastavlja manje-više normalan razvoj, dok idiobiontska grupa zaustavlja razvoj i rast domaćina nakon ovipozicije (Askew i Shaw, 1986). Većina koinobiontskih parazitoida pripada endoparazitskoj grupi, dok ektoparazitska grupa obuhvata uglavnom idiobionte.

Brakonide, kao i druge grupe parazitskih osa, imaju veliki značaj u regulisanju brojnosti mnogih fitofagnih grupa insekata. Mnoge vrste se koriste u programima

biološke kontrole štetnih insekata širom sveta (Goldson et al., 1992; Mohyuddin et al., 1981; Overholt et al., 1994).

1.2. Filogenija brakonida i pozicija potfamilije Aphidiinae

Iako ne postoji opšte slaganje oko broja potfamilija u okviru porodice Braconidae, one se mogu generalno podeliti na dve grupe: evolutivno starija, takozvana ciklostomna grupa (sa depresijom na klipeusu) koji su pretežno idiobionti, dok ostatak potfamilija pripada neciklostomnoj grupi (koinobionti), čije jedinke imaju klipeus koji potpuno prekriva prednji deo usnog otvora (Askew i Shaw, 1986; Gauld, 1988). Odnos između brakonidnih potfamilija je bio predmet brojnih studija i polemike između različitih autora tokom proteklih godina (Achterberg, 1976; Čapek, 1970; Quicke i van Achterberg, 1990; Tobias, 1967). Najopsežniju morfološku studiju su sproveli Quicke i van Achterberg (1990) koristeći 96 morfo-anatomskih karaktera na larvenim i adultnim stadijumima svih porodica. Njihova analiza je bazirana na matriksu morfoloških karaktera predstavnika svih porodica, i pri tom su dobili precizne odnose između različitih potfamilija koje su predstavili kladogramima (videti Quicke i van Achterberg, 1990). Međutim, filogenetske analize bazirane samo na morfološkim karakteristikama često predstavljaju problem pri polarizaciji karaktera, takođe, teško je utvrditi da li je gubitak neke strukture kod nekih linija zbog homolognih ili konvergentnih evolutivnih događaja (Gibson, 1985). U cilju prevazilaženja ovakvih i sličnih problema, molekularne analize su uključene kako bi se bolje objasnili odnosi između brakonidnih potfamilija (Belshaw i Quicke, 2002; Whitfield et al., 2002; Xue-Xin et al., 2003). Međutim, postoji mišljenje da korišćenje određenog seta molekularnih podataka neće precizno rekonstruisati filogenetske odnose u okviru porodice Braconidae ili drugih grupa, već da treba koristiti kombinaciju molekularnih podataka zajedno sa morfološkim karakteristikama i drugim podacima u cilju što pouzdanijih filogenetskih odnosa (Will i Rubinoff, 2004). Belshaw i Quicke (2002) su koristili parcijalne sekvence gena 28S rRNK i 18S rRNK u kombinaciji sa nekim životnim strategijama kako bi što bolje rasvetlili filogeniju brakonida. Takođe, Dowton et al., (2002) su za filogenetske analize brakonida koristili fragmente gena za 16S rRNK i 28S rRNK u kombinaciji sa serijom morfoloških

karaktera pri čemu se pokazalo da je potfamilija Aphidiinae sestrinska grupa ciklostomnih potfamilija.

Položaj Aphidiinae unutar familije Braconidae je relativno nejasan i tretiran na različite načine: kao visoko izvedena neciklostomna grupa (Čapek, 1970), kao ciklostomna (Wahl i Sharkey, 1993), i kao grupa koja nije srodna ni sa jednom (Achterberg, 1984) i nalazi se između bazalne ciklostomne i izvedene neciklostomne grupe (Quicke i van Achterberg, 1990). Aphidiinae se često dovode u vezu sa potfamilijom Euphorinae (Tobias, 1989). Razlog za filogenetsku srodnost ove dve potfamilije je parazitiranje adultnog stadijuma domaćina što karakteriše jedino ove dve potfamilije u okviru brakonida. Međutim, neke analize ne podržavaju filogenetsku srodnost između ove dve grupe (Shaw i Huddleston, 1991).

Aphidiinae su prvobitno razmatrane kao posebna familija – Aphidiidae zbog svojih specifičnih morfoloških karakteristika, a takođe i zbog svoje specijalizacije parazitiranja isključivo biljnih vaši (Stary, 1966a). Međutim, na osnovu filogenetskih istraživanja (Quicke i van Achterberg, 1990; Wharton et al., 1992) pokazalo se da afidiine ipak pripadaju familiji Braconidae sa statusom potfamilije. Potfamilija Aphidiinae predstavlja koherentnu grupu parazitoida pre svega na osnovu njihove biologije. Postoje brojna neslaganja kada je u pitanju filogenetski položaj pojedinih taksona unutar same potfamilije, pošto različiti autori različito vrednuju određene karaktere i predlažu često oprečne interpretacije. Urađene su brojne filogenetske studije zasnovane na morfologiji larvi i adulta (Chou, 1984; Finlayson, 1990; Gärdenfors, 1986; Mackauer, 1961; Mackauer et al., 1968; O'Donnell, 1989), embriologiji (Tremblay i Calvert, 1971) i sekvencama DNK (Belshaw i Quicke, 1997; Derocles et al., 2012; Kambhampati et al., 2000; Sanchis et al., 2000; Shi and Chen, 2005; Smith et al., 1999).

Belshaw i Quicke (1997) su među prvima ispitivali filogenetske relacije afidiina. Njihova analiza je bila zasnovana na DNK sekvencama tri gena: mitohondrijalni citohrom b, jedarni elongacioni faktor 1-alfa i jedarna 28S rRNK. Parsimonijska analiza DNK sekvence gena za citohrom b rezultirala je kladogramom na kome su odnosi u okviru brakonida prilično nerazjašnjeni, a monofiletsko poreklo familije ima slabu podršku. Analiza DNK sekvence za elongacioni faktor 1-alfa je pokazala da Aphidiinae imaju čak polifiletsko poreklo. Monofiletsko poreklo ciklostomnih potfamilija je

potvrđeno u navedenoj studiji, međutim potfamilija Aphidiinae je odvojena od ciklostomne grupe ali odnos između afidiina i neciklostomnih potfamilija, kao i odnosi unutar same neciklostomne grupe, nisu bili rešeni. Što se tiče filogenetskih odnosa unutar same potfamilije Aphidiinae, njihovi rezultati ukazuju na jasno izdvajanje tribusa Ephedrini i Praini, pri čemu je Praini sestrinska grupa kladi koju zajedno čine Aphidiini i Trioxini. U ovom slučaju, rezultati Belshaw i Quicke-a podržavaju izdvajanje četiri tribusa u okviru potfamilije: (Ephedrini + (Praini + (Aphidiini + Trioxini))) što je u skladu sa podelom koju je predložio (Mackauer, 1961). Veoma značajan podatak je da filogenija dobijena na ovaj način podržava sekundarni gubitak unutrašnjeg ulutkavanja unutar tribusa Praini i polifiletsko poreklo endoparazitizma unutar familije Braconidae. Rezultati dobijeni analizom ova tri gena su u skladu sa rezultatima filogenetske studije koju je sproveo Whitfield (1992) na osnovu morfoloških karaktera.

Jedna od najprihvaćenijih klasifikacija afidiina, tj. podela na tribuse, je ona koju je predložio Mackauer (1961). U to vreme su afidiine imale status familije pa je podela bila u stvari na potfamilije, a sada tribuse: Aclitini, Aphidiini, Ephedrini i Praini. Od ova četiri tribusa, najveći broj vrsta pripada tribusu Aphidiini koji se često deli na dva podtribusa: Aphidiina i Trioxina. U zavisnosti od prihvaćenih kriterijuma, Trioxini i Aphidiini se tretiraju ili kao dva nezavisna tribusa, formirajući četvoro-tribusnu hipotezu (Ephedrini + (Praini + (Trioxini + Aphidiini))) (Tremblay i Calvert, 1971; O'Donnell, 1989; Finlayson, 1990; Belshaw i Quicke, 1997) ili se često grupišu u zajednički tribus (Aphidiini) i na taj način formiraju trotribusnu hipotezu: Ephedrini, Praini i Aphidiini (Mackauer, 1961; Mackauer et al., 1968; Sanchis et al., 2000; Smith et al., 1999; Tobias, 1967).

Najveća kontroverza u vezi sa filogenijom afidiina se tiče bazalne linije u okviru potfamilije. Definisavanje osnovne linije je veoma važno kako bi se bolje sagledala evolutivna i životna istorija ove grupe, kao što su: struktura otrovnog aparata, ponašanje pri ulutkavanju i iskorišćavanje domaćina. Svaki od gore pomenutih tribusa je predložen kao osnovni. Ephedrini, na osnovu morfologije imaga, kompletne nervature krila (Gärdenfors, 1986; Mackauer, 1961) i analize DNK sekvenci (Belshaw i Quicke, 1997; Sanchis et al., 2000), Praini na osnovu načina ulutkavanja, morfologije otrovnih žlezda (Edson i Vinson, 1979; Tobias, 1967; Tobias i Kyriak, 1971) i analize DNK sekvenci (Smith et al., 1999), Aclitini na osnovu ukupne morfologije, ponašanja (Chou, 1984) i

analize DNK sekvenci (Kambhampati et al., 2000) i Trioxina (= Aphidiini), na osnovu morfologije poslednjeg larvenog stupnja (Finlayson, 1990).

1.3. Pregled dosadašnjih istraživanja brakonida u Srbiji

Fauna brakonidnih osa je često istraživana na teritoriji Srbije, kao i na širem području Balkanskog poluostrva (Papp, 1973, 2009; Brajković, 1989a; Žikić et al., 2000, 2010, 2012a,b,c). Papp (2009) je u svojoj studiji o familiji Braconidae na teritoriji bivše SFR Jugoslavije utvrdio 310 vrsta iz 10 potfamilija. Takođe, doprinos fauni brakonidnih osa za teritoriju Srbije dali su Žikić et al. (2010), u navedenoj faunističkoj studiji prijavljuju 30 vrsta brakonida, od toga dva novoregistrovana roda: *Rhamphagathis* (Agathidinae) i *Charmon* (Charmontinae). Opsežno istraživanje brakonidnih osa na teritoriji južne Srbije (Sićevačka klisura) dao je Žikić (2000) koji je registrovao čak 234 vrste iz 65 rodova, odnosno 18 potfamilija. Čak 149 vrsta i 5 rodova je po prvi put registrovano u fauni Srbije.

Naročito je dobro istražena fauna potfamilije Aphidiinae kako na teritoriji Srbije, tako i na području nekih susednih država na Balkanu kao što su Crna Gora, Bugarska i Grčka (Atanassova, 1997; Starý et al., 1998; Kavallieratos i Tomanović, 2001; Kavallieratos et al., 2004, 2010; Kavallieratos i Starý, 2011; Tomanović i Brajković, 2001; Tomanović i Kavallieratos, 2002; Tomanović et al., 2003, 2008; Todorov, 2007; Petrović et al., 2009; Žikić et al., 2012a). Prve podatke o afidiinama Srbije dao je Vukasović (1928) koji je registrovao devet vrsta: *Aphidius ervi* Haliday, *A. rosae* Haliday, *A. urticae* Haliday, *A. sonchi* Marshall, *Praon volucre* (Haliday), *Tryoxis acericola* (Starý & Mackauer), *Lysiphlebus dissolutus* (Nees), *Ephedrus lacertosus* (Haliday) i *Diaeretiella rapae* (M'Intosh). Takođe, Mitić-Mužina i Srdić (1977), u svom radu o prirodnim neprijateljima biljnih vaši daju nove podatke o afidiinama na teritoriji Srbije *Aphidius uzbekistanikus* Luzhetzki, *A. rhopalosiphi* De Stefani Perez, *A. picipes* (Nees), *Praon gallicum* (Starý) i *Ephedrus plagiator* (Nees). U sličnoj studiji Petrović (1992) navodi *Adialytus ambiguus* Haliday, kao novu vrstu za našu faunu. Tomanović (1994) u svojoj studiji o parazitskim osama i lucerkinoj vaši navodi tri nove vrste za teritoriju Srbije: *Praon barbatum* Mackauer, *Lipolexis gracilis* Foerster i *Trioxys*

complanatus Quilis. Doprinos fauni afidiina dao je Žikić (1999) koji je tokom trogodišnjeg istraživanja na području Sićevačke klisure registrovao 40 vrsta potfamilije Aphidiinae, od toga dve nove vrste su po prvi put registrovane u našoj fauni: *Aclitus obscuripennis* Foerster i *Paralipsis enervis* (Nees von Esenbeck) obe su paraziti vaši korena biljaka i vrlo retko nalažene. Najnoviji popis afidiina Srbije i Crne Gore dali su Žikić et al. (2012a) sa tritrofičkim asocijacijama. U radu su popisane 122 vrste afidiina iz 23 roda, takođe, predstavljene su asocijacije sa biljnim vašima, kao i biljke na kojima su te vaši registrovane. Najveći doprinos istraženosti faune Aphidiinae je dao Tomanović sa saradnicima, pri čemu je opisao veći broj vrsta na teritoriji Balkana (Tomanović, 2001; Tomanović et al., 2003, 2004, 2006, 2009).

1.4. Biologija i ekologija afidiina (ekonomski značaj)

U potfamiliju Aphidiinae spada preko 400 opisanih vrsta širom sveta (Starý, 1988). U evropskoj fauni je do sada poznato oko 200 vrsta (Achterberg, 2013). Svi predstavnici su solitarni koinobiontski endoparazitoidi biljnih vaši (Hemiptera: Aphidoidea) (Mackauer i Starý, 1967).

Opšti plan građe je tipičan kao i za sve Braconidae. Osnovna razlika afidiina od ostalih brakonida je u građi metazome. Naime, svi predstavnici potfamilije Aphidiinae imaju fleksibilnu suturu između drugog i trećeg tergita metazome što predstavlja jasnu apomorfiju. Dužina tela je najčešće oko 1-2 mm, tako da pored nekih vrsta iz potfamilije Alysiniinae (*Aspilota* grupa) predstavljaju najsitnije brakonide.

Aphidiinae imaju veoma raznovrsnu biologiju i ponašanje. S obzirom na malu kompeticiju sa drugim parazitoidima, izuzev nekih iz familije Aphelinidae (Hymenoptera), postoji svega nekoliko vrsta biljnih vaši koje su izbegle da budu parazitirane (Mackauer i Starý, 1967) ili njihovi parazitoidi još uvek nisu registrovani. Aphidiinae pokazuju različite specifičnosti prema afidinim domaćinima. Neke parazitiraju blisko srodne vrste biljnih vaši ili one koje dele isto stanište (Mackauer et al., 1996), dok ima i vrsta (npr. *Ephedrus persicae* Frogatt) koje parazitiraju preko 100 vrsta domaćina (Gärdenfors, 1986). Starý (1981) definiše 5 tipova specifičnosti parazitoida prema afidnim domaćinima:

1. ograničenost na 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 dve ili više potfamilija iste familije
5. ograničenost na nekoliko rodova iz dve ili više familija

Ukoliko su parazitoide ograničeni samo na jednu vrstu u pitanju je striktna monofagija, sa druge strane, ukoliko parazitiraju nekoliko ili veći broj vrsta, onda se radi o oligo-, odnosno polifagiji. Striktna monofagija je karakteristična pre svega za filogenetski progresivnije grupe koje parazitiraju vaši iz potfamilija Callaphidinae, Chaitophorinae, Aphidinae i Lachninae. Kod nekih primitivnijih potfamilija biljnih vaši kao što su: Hormaphidinae, Anoecinae, Mindarinae, Pemphiginae ili Thelaxinae, javlja se oligo- ili polifagija kao odgovor parazitoide (Starý, 1981). Međutim, određivanje evolutivnih trendova parazitoide samo na osnovu njihovih domaćina može biti sporno, s obzirom na to da su često drugačiji rezultati dobijeni kada su bili uključeni drugi kriterijumi kao što su morfologija, anatomija, embriologija itd. Ovakva situacija ukazuje na pojavu drugačijih evolutivnih trendova nekih rodova parazitoide koji su rezultirali asocijacijom sa najmlađom i najbrojnijom grupom biljnih vaši – Aphidinae. Iako su afidni domaćini nesumnjivo od ključne važnosti za pojavu i samu evoluciju njihovih parazitoide, ta važnost je ponekad preuveličana kao što to ističe Mackauer (1965). On je na osnovu opsega domaćina afidnih parazitoide zaključio da postoji snažan „parazitofiletski“ trend koji ističe paralelnu evoluciju između biljnih vaši i njihovih parazitoide. Međutim, Starý (1970) smatra da paralelna evolucija nije jedino objašnjenje u procesu evolucione interakcije biljnih vaši i njihovih parazitoide. Naime, odgovori parazitoide i njihovih domaćina na promene životne sredine mogu, ali i ne moraju, da budu isti. Takođe, filogenetski paralelizam ne može da objasni zašto je određena afidna grupa (ili vrsta) parazitirana različitim vrstama parazitoide u različitim delovima sveta, jer ukoliko bi evoluciona interakcija zaista bila paralelna, očekivale bi se identične asocijacije biljnih vaši i parazitoide. I konačno, postavlja se pitanje u kom trenutku počinje proces paralelne evolucije, s obzirom na to da se i biljne vaši i parazitoide menjaju u toku evolucionog procesa.

Što se tiče životne istorije, Aphidiinae parazitiraju sve stadijume biljnih vaši osim jajeta (Starý, 1981). Međutim, najveći broj vrsta polaže jaja u II i III larvalni stupanj domaćina (Mackauer et al., 1996) jer je time izbegnuto da je domaćin suviše mali (ne bi podneo ubadanje legalicom) ili suviše veliki (branio bi se ili pobjegao). Primećeno je da neke vrste traže striktno odgovarajući uzrast domaćina, npr. polažu jaja isključivo u adultni stadijum biljne vaši. Tako, na primer, vrsta *Dyscritulus planiceps* (Marshall) parazitira samo krilate jedinke iz roda *Drepanosiphum* (Völkl i Mackauer, 1996). Morfologija i ponašanje domaćina, koje može biti različito u zavisnosti od stupnja, utiče na uspešnost parazitiranja. Na primer, debljina kutikule, odbrambeno ponašanje, kao što su udarci nogama, bekstvo i padanje sa biljke predstavljaju karakteristike koje zavise od starosti domaćina i mogu uticati na efikasnost parazitiranja.

Ženke afidiina pri parazitiranju najčešće podvlače metazomu ispod toraksa promaljavajući legalicu između nogu i ispod glave, tako nišaneći i ubadajući žrtvu (Slika 1). Procena abdominalne pokretljivosti i domena legalice se lako može utvrditi preko elongacionog indeksa $L=(a+b)/b$, gde a predstavlja distancu između linije koja se postavlja vertikalno u odnosu na čelo glave i vrha legalice, dok b predstavlja distancu između propodeuma i čela (Völkl i Mackauer, 2000). Ukoliko je vrednost indeksa 1, to ukazuje da legalica ne može da se istegne dalje od linije koja je normalna u odnosu na glavu, dok vrednosti iznad 1 pokazuju da se abdomen može znatno izdužiti ispred glave za vreme ovipozicije. Rezultati o ponašanju afidiina pri ovipoziciji koje su dali Völkl i Mackauer (2000) su pokazali da vrsta *Aclitus obscuripennis* skoro da nije imala pokretljivost abdomena, dok za razliku nje, *Protaphidius wissmannii* Ratzeburg može da izduži abdomen čak pet puta u odnosu na glavu i toraks.

Na osnovu ponašanja prilikom ovipozicije sve afidiine se mogu podeliti u šest grupa koje su predložili Völkl i Mackauer (2000).

Tip I. Kod vrsta koje pripadaju ovom tipu ne postoje neke posebne adaptacije za hvatanje i pridržavanje domaćina pri polaganju jaja. Vreme polaganja jajeta je umereno dugo, (između pet i deset sekundi) a elongacioni indeks je oko 2,2. U ovu grupu spadaju neke vrste iz tribusa Ephedrini (*Ephedrus californicus* Baker, *E. laevicollis* Thomson, *E. niger* Gautier, Bonnamour & Gaumont i *E. plagiator* Nees). Ovaj tip ovipozicije predstavlja predačku liniju u okviru Aphidiinae, na šta ukazuje i prisustvo

pleziomorfnih karaktera kod adulta i poslednjeg larvenog stadijuma (Gärdenfors, 1986; Mackauer, 1961).

Tip II. U ovu grupu spadaju vrste koje pri ovipoziciji koriste prednje noge za pridržavanje domaćina. Ženke mogu da isture abdomen do dve dužine svoje glave, pri čemu je vreme ovipozicije relativno kratko (1,6-2s). Ovde spadaju vrste roda *Praon* Haliday kao i njima srodna vrsta *Dyscritulus planiceps* (Marshall). Slično ponašanje imaju i vrste iz roda *Monoctonus* Haliday s tim što ove vrste privremeno parališu domaćina ubadanjem u torakalnu gangliju između prvog i drugog para nogu domaćina (Calvert i Van den Bosch, 1972). Vreme ovipozicije je relativno dugo, tako na primer kod vrste *Monoctonus paulensis* (Ashmead) traje nekoliko minuta pri čemu ženka polaže jedno ili više jaja u domaćina (Michaud i Mackauer, 1995).

Tip III. Obuhvata vrste roda *Trioxys* Haliday, *Acanthocaudus* Smith i *Binodoxys* Mackauer (Trioxina). Ženke ovih vrsta imaju na abdomenu viljuškaste nastavke pomoću kojih pridržavaju domaćina tokom ovipozicije (Schlinger i Hall, 1961). Nastavci omogućavaju prodor kroz domaćinovu kutikulu, ali istovremeno ograničavaju opseg veličine domaćina na mali prvi i drugi stupanj (Eidmann, 1924). Vreme polaganja jajeta je umereno dugo, a elongacioni indeks je oko 2,3.

Tip IV. Vrste ove grupe imaju elongacioni indeks ≥ 3 i umereno do veoma dugo vreme polaganja jaja. Ovakvo ponašanje se javlja pre svega kod vrsta iz roda *Pauesia* Quilis i njima srodnih rodova i verovatno se razvilo kao taktika za izbegavanje simbiotskih mrava koji su često u asocijaciji sa domaćinima iz potfamilije Lachninae (Aphididae) na četinarima.

Tip V. U ovoj grupi su vrste koje imaju kratko vreme polaganja jaja < 0.5 s, takozvano „brzo“ ubadanje. Ženke na ovaj način izbegavaju direktan kontakt tela sa potencijalnim domaćinom i samim tim smanjuju rizik od povrede tokom domaćinove odbrane. Pretpostavlja se da se ovakvo ponašanje razvilo nezavisno u nekoliko klada Aphidiinae ili, mada manje verovatno, javilo jednom, ali se sekundarno izgubilo u nekim rodovima. Elongacioni indeks za vrste iz ove grupe je 2,0-2,4. Ovde pripadaju vrste uglavnom iz tribusa Aphidiini. Još uvek je nejasno da li je kratko vreme polaganja jaja izvedeno iz tipa II ili iz tipa IV, ili je, alternativno, predačko ponašanje.

Tip VI. Ovoj grupi pripadaju vrste koje poseduju hemijske mehanizme za odbranu od mrava (Völkl, 1992; Völkl i Mackauer, 1996). Neke vrste, kao što je *Aclitus obscuripennis* Foerster imaju stečenu hemijsku kamuflažu. Vrste roda *Adialytus* i neke vrste iz roda *Lysiphlebus* Foerster imaju hemijsku mimikriju. Osim toga, *Lysiphlebus* linija obuhvata dve grupe koje se razlikuju u vremenu polaganja jaja: vrste koje imaju relativno kratko vreme, oko jedne sekunde (*L. fritzmuelleri* Mackauer i *L. testaceipes* (Cresson)) i vrste koje imaju relativno dugo vreme polaganja jaja, oko jednog minuta (*L. cardui* (Marshall), *L. confusus* Tremblay & Eady, *L. hirticornis* Mackauer, *L. melandriicola* Starý).

Parazitoidi koriste različite fizičke i hemijske signale u procesu odabira domaćina, pri čemu važnu ulogu imaju sam genotip parazitoida, njegovo fiziološko stanje, kao i prethodna prilagođenost uslovima sredine. Veoma je važno da ženka parazitoida eliminiše neodgovarajuće stanište ili nepodesnog domaćina u procesu njegove selekcije. Hågvar i Hofsvang (1991) detaljno objašnjavaju proces selekcije domaćina specijalno za afidiine. Arthur (1971) i Weseloh (1981) analiziraju procese pronalaženja i prihvatanja domaćina kod parazitskih osa. Michaud i Mackauer (1994) razlikuju tri koraka u procesu selekcije: prepoznavanje, procena i prihvatanje domaćina. Prema njima celokupan proces selekcije domaćina se može opisati na sledeći način:

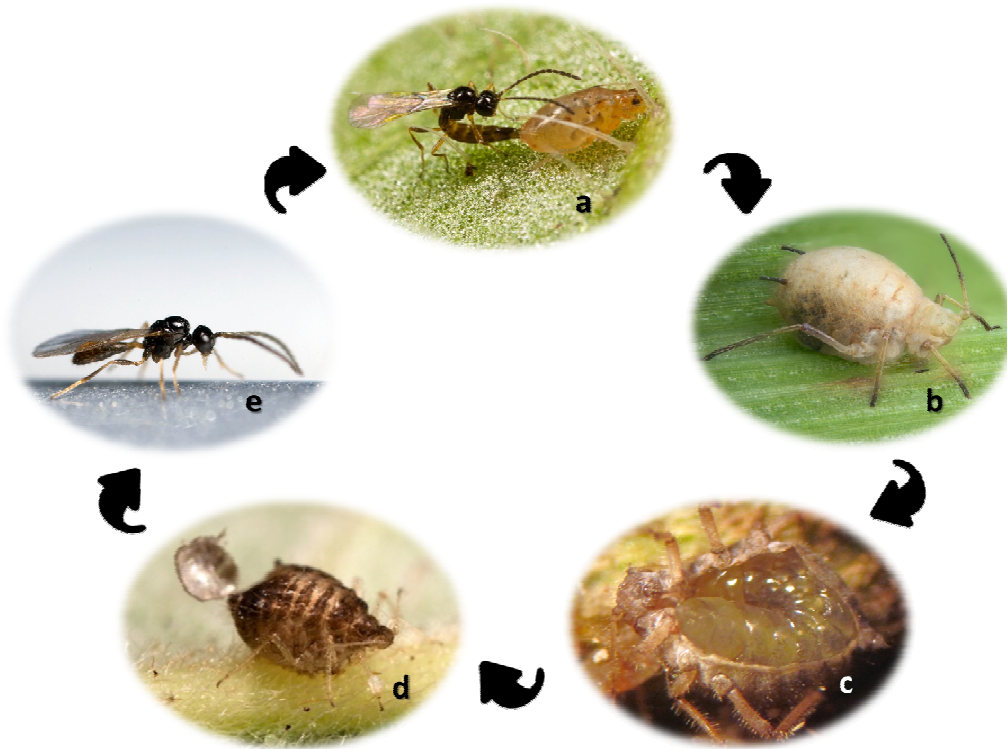
1. Pronalaženje staništa domaćina. Ženka traži staništa gde se nalaze odgovarajuće biljke hraniteljke kao i sami domaćini.
2. Pronalaženje domaćina. Ženka traži domaćina, na, ili veoma blizu biljaka na kojima je potencijalni domaćin.
3. Prepoznavanje domaćina. Nakon pronalaženja domaćina, ženka istražuje domaćina uz pomoć antena i ubadanjem legalice.
4. Prihvatanje domaćina. Parazitoid ispituje domaćina i odlučuje da li da položi jaje.
5. Podobnost domaćina. Polaganje jajeta, kao i sam razvoj zavise od fiziološkog stanja domaćina.
6. Regulacija domaćina. Larva parazitoida može uticati na razvoj, ponašanje, fiziologiju i morfologiju samog domaćina.

Prvih pet koraka u procesu odabira domaćina uključuje upotrebu mirisnih, vizuelnih i taktilnih signala. Pri pronalaženju staništa domaćina, kao i samog domaćina, parazitoide u prvom koraku koriste dalekosežne signale kao što su elektromagnetno zračenje, zvuk ili miris. Hemijski signali imaju glavnu ulogu u svakom koraku pri traženju i selekciji pogodnog domaćina. Semiohemikalije koje emituje biljka hraniteljka, domaćin sa biljke hraniteljke, organizmi koji su u asocijaciji sa domaćinom ili kombinacija svega navedenog su vrlo važni u lociranju staništa domaćina, a posredno i samog domaćina (Vinson, 1976, 1984). Parazitoide reaguju na biljke hraniteljke, obično su privučeni sinonimima koje proizvode same biljke, a ponekad i vizuelnim signalima. Međutim, olfaktorni odgovori na isparenja biljaka su dominantni u odnosu na vizuelne pri lociranju domaćina kod afidiina. Wickremasinghe i van Emden (1992) su ukazali na jaku privlačnost mirisima biljaka i vaši kod nekoliko asocijacija parazitoide i vaši. Međutim, neke vrste afidiina ne reaguju na mirise biljaka. Parazitoide koji napadaju polifagne vaši verovatno manje koriste biljna isparenja pri lociranju staništa domaćina. Na primer vrsta *Aphidius nigripes* Ashmead parazitira polifagne vaši, pa samim tim ne reaguje na isparenja biljaka (Bouchard i Cloutier, 1985). Nekoliko studija u vezi sa interakcijama parazitoid-domaćin kod parazitoide koji preferiraju određenog domaćina, kao što je *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) i njenog domaćina vrste *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus), ukazuju da ova vrsta parazitoide radije koristi mirise biljke domaćina nego samog domaćina pri lokaciji staništa domaćina. Glavna hemijska komponenta kod biljaka iz familije kupusa je alil izotiocijanat i pokazano je da ova supstanca predstavlja glavni atraktant parazitoide u olfaktometrijskim testovima (Read et al., 1970; Sheehan i Shelton, 1989).

Nakon lociranja potencijalnog staništa afidnog domaćina, parazitoide počinju da traže domaćina na biljci ili blizu same biljke domaćina. Ženke parazitoide reaguju na fizičke, hemijske i vizuelne stimuluse koji su u vezi sa njihovim domaćinom pre nego što se i približe samom domaćinu. Većina hemijskih stimulusa su u stvari kairomoni koje proizvodi sam domaćin ili potiču od produkata domaćina. Pokazano je da čak i medna rosa koju izlučuju biljne vaši može privući njihove parazitoide (Wickremasinghe, 2012). Takve supstance utiču na ponašanje ženki parazitoide tako što smanjuju brzinu kretanja, povećavaju učestalost naglih okreta parazitoide, što sve povećava šanse za pronalaženje domaćina.

Sposobnost ženke parazitoidea da razlikuje parazitiranu od neparazitirane vaši od strane parazitoidea koji pripadaju istoj ili drugoj vrsti ima veoma važnu ulogu pri izboru domaćina (Le Ralec et al., 2010). Do sada su opisana dva mehanizma prepoznavanja domaćina koji su već parazitirani istom vrstom parazitoidea i koji uključuju prepoznavanje spoljašnjih i unutrašnjih signala, koji su prvenstveno hemijskog porekla. Unutrašnji markeri potiču od nekih ubrizganih komponenti prilikom polaganja jaja parazitoidea ili od fizioloških modifikacija domaćina indukovanih razvojem larve parazitoidea. Spoljašnje signale može da ostavi ženka koja je položila jaja ili koji potiču od sekreta kornikula.

Da bi se uspešno razvio parazitoid unutar tela domaćina, neophodni su faktori koje proizvode otrovni aparat i jajnici. Oni se zajedno sa jajima ubrizgavaju u telo domaćina, kao i teratocite koje se obrazuju u telu domaćina. Teratocite se ne umnožavaju, ali povećavaju veličinu, postaju poliploidne i osim kao hrana, imaju važnu ulogu u supresiji imunog sistema domaćina (Beckage i Gelman, 2004). Parazitoidi koriste različite strategije suočavanja sa imunim sistemom domaćina, od izbegavanja do aktivne supresije imunog odgovora (Poirié et al., 2009). Na primer vrsta *Monoctonus crepidis* (Haliday) koristi strategiju skrivanja. Naime, ona ubacuje svoju legalicu blizu ventralne nervne ganglije domaćina, i deponuje jaja u gangliju koja se na taj način štite od cirkulatornih hemocita (Griffiths, 1961).



Slika 1. Životni ciklus afidiina: **a)** Ovipozicija u domaćina. **b)** Parazitirana biljna vaš- mumija. **c)** Poslednji stupanj larve u domaćinu. **d)** Prazna mumija sa operkulomom. **e)** Imago parazitoida.

Parazitirani domaćin, sa larvom ose u sebi, nastavlja da se hrani i više-manje se ponaša uobičajeno. Pre nego što biljna vaš bude potpuno pojedena, parazitoid najčešće dovodi do kastracije i propadanja formiranih embriona unutar uterusu domaćina. Kastracija domaćina dovodi u stvari do preraspodele resursa ka razvoju larve parazitoida. Tako na primer, kastracija vrste *Acyrtosiphon pisum* (Harris) od strane *Aphidius ervi* je posredovana kombinacijom otrova i teratocita (Digilio et al., 2000; Falabella et al., 2000). Meta otrova su gornji delovi ovarijuma domaćina pri čemu dolazi do degeneracije germinativnog sloja jajnika i mladih embriona. Kod mladih stadijuma domaćina, jajnici se uopšte ne razvijaju tako da je kastracija kompletna. Kod starijih stadijuma koji već sadrže razvijene embrione, kastracija se postiže teratocitama.

Razviće afidiina se odvija kroz tri larvena stupnja, zrela larva trećeg stupnja ubija domaćina. Larva zatim progriza postepeno ovalan otvor na ventralnoj strani domaćina i pričvršćuje ga za biljku pomoću sekreta pljuvačnih žlezda. Nakon fiksiranja

domaćina, larva oblaže integument domaćina sekretima pljuvačnih žlezda. Sam egzoskelet domaćina, u početku providan, postaje deblji, donekle menja oblik i postaje takozvana mumija. Boja mumija je najčešće žućkaste do braon boje, ali ima i crnih. Neki rodovi, kao što su *Praon* i *Dyscritulus*, se ulutkavaju u specifičnim kokonima koje prave ispod egzoskeleta domaćina. Nakon metamorfoze, imago mandibulama progriza pravilan otvor kružnog oblika, obično na zadnjem kraju tela domaćina u predelu kornikula, gura progrizeni deo u vidu poklopca i izlazi napolje (Slika 1). Odmah nakon eklozije sledi čišćenje tela i sušenje mlade ose. Adulti se hrane mednom rosom, ukoliko u blizini postoji kolonija biljnih vaši, ili odlaze do cvetova sa plitkom čašicom, da bi uzeli nektar. Nakon hranjenja jedinke se sparuju, a onda ženke kreću u potragu za domaćinima. Mužjaci se mogu pariti sa više ženki tokom života, dok se ženke pare samo jednom (Stary, 1966b).

Skoro sve afidiine na području centralne Evrope hiberniraju u prepupalnom stadijumu unutar mumificiranog domaćina. Verovatno jedini izuzetak je vrsta *Paralipsis enervis* (Nees) koja prezimljava kao adult u gnezdima mrava (Stary, 1966b). Takođe, tokom nepovoljnog perioda, neke vrste ulaze u dijapauzu. Dijapauza je u vezi sa životnim ciklusom domaćina ili sa migracijama na druge tipove staništa, koji zavise od sezone, geografskog područja, biljke domaćina i slično. Kao i hibernacija, i dijapauza se dešava u prepupalnom stadijumu. Larva pravi poseban tip kokona koji se jasno razlikuje od onih koji ne podležu dijapauzi. Na primer, mumije jedinki *Ephedrus persicae* koje ne ulaze u dijapauzu su tipičnog izgleda, dok se kokoni u dijapauzi odlikuju krupnijim mumijama, globularnog i sjajnog izgleda, pri čemu se ne vidi segmentacija mumije (Stary, 1966b).

Mnoge vrste afidiina značajno utiču na smanjenje brojnosti biljnih vaši. Međutim, ponekad je teško proceniti njihovu ekonomsku efikasnost, naročito na ruderalnim mestima gde se ne posmatra njihova aktivnost u cilju zaštite bilja. Mnogi faktori utiču na samu efikasnost parazitoida, neki od njih su: gustina populacija parazitoida i domaćina, fekunditet, ponašanje, dostupnost određenih stupnjeva i stadijuma domaćina, aktivnost prirodnih neprijatelja parazitoida, abiotički faktori itd. S obzirom da mnoge vrste biljnih vaši postaju rezistentne na neke od komercijalnih insekticida, kao i podsticanje organske proizvodnje, korišćenje i proučavanje afidiina u cilju biološke kontrole je veoma aktuelno. Najčešće se programi biološke kontrole sprovode u zatvorenim prostorima, kao što su staklenici, međutim postoje i programi

uvođenja alohtonih vrsta parazitoida u nove ekosisteme (Hågvar i Hofsvang, 1991; Way i Van Emden, 2000). Mnoge vrste su korišćene ili se koriste kao agenti biološke kontrole, takve su na primer vrste: *Aphidius matricariae* Haliday za kontrolu vaši *Aphis gossypii* Glover u poljima pamuka, kao i *Myzus persicae* Sulz na krastavcu u Holandiji, na različitom povrću u Nemačkoj i na paradajzu u Kanadi. Za borbu protiv lešnikove vaši *Myzocallis coryli* (Goeze) korišćena je vrsta *Trioxys pallidus* (Haliday) koja je introdukovana iz Evrope u SAD (Messing i AliNiazee, 1989). Jedan od vrlo uspešnih primera introdukcije je i vrsta *Lysiphlebus testaceipes*, koja se koristi za borbu protiv citrusne vaši (*Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe)) u oblasti Mediterana (Starý et al., 1988). Međutim, neophodno je izvršiti procenu efikasnosti, kao i potencijalni uticaj alohtonih vrsta na zajednicu u ekosistemima u koje su introdukovane. Tako na primer, pomenuta vrsta *L. testaceipes* se uspešno prilagodila novom području, i proširila širom Mediterana. Međutim, poslednjih godina ova vrsta se proširila i na unutrašnje delove Evrope i u direktnoj je kompeticiji za domaćinima sa nekim autohtonim vrstama afidiina (Mitrović et al., 2013; Starý et al., 2004).

Danas se mnoge vrste afidiina proizvode u komercijalne svrhe, tako da se mogu kupiti mumije koje se uz pomoć mehanizma sa ventilatorima raspršuju u staklenicima i sličnim objektima. Takođe, u poslednje vreme se parazitoidi mogu gajiti *in vitro* upotrebom hranljivog medijumima koje su patentirale pojedine kompanije (Viridaxis[®]).

1.5. Podtribus Lysiphlebina

Podela afidiina na tribuse, kao što je istaknuto prethodno, nije usklađena. Najčešće korišćena podela je četvorotribusna hipoteza koju je predložio Mackauer (1961). Tribus sa najvećim brojem vrsta je svakako Aphidiini, i ukoliko ga razmatramo *sensu* Mackauer obuhvata pet podtribusa: Paralipsina, Lysiphlebina, Archaphidina, Protaphidiina i Aphidiina.

Podtribus Lysiphlebina obuhvata svega tri roda, *Adialytus* Foerster, *Lysiphlebia* Starý & Schlinger i *Lysiphlebus* Foerster.

Lysiphlebus je najveći rod i predstavlja tipski rod subtribusa Lysiphlebina. Do sada je opisano više od 20 vrsta širom sveta, od toga polovina živi u Evropi. Rod *Lysiphlebus* je ustanovio Foerster (1862) nakon revizije tipskog materijala tj. tipske vrste „*Bracon dissolutus*“ koju je opisao Nees (1811), i koja je verovatno obuhvatala nekoliko vrsta. Međutim, originalni tipski materijal iz Foerster-ove zbirke je očuvan i bez sumnje predstavlja vrstu *Lysiphlebus dissolutus* (Nees) na osnovu koje je opisan ovaj rod. Osnovni morfološki karakteri po kojima se rod *Lysiphlebus* razlikuje od ostalih afidiina su pre svega krilna nervatura, koja je znatno redukovana; gladak propodeum, retko sa dva grebena u distalnom delu; kao i karakteri na genitalijama ženki (Starý, 1975).

Rod *Adialytus* je dugo bio razmatran kao podrod u okviru roda *Lysiphlebus*, sa kojim deli niz morfoloških karakterata (Starý, 1975; Starý i Schlinger, 1967). Prvi put je ustanovljen 1862. godine tipskom vrstom *Adialytus tenuis* Foerster (syn. *Adialytus salicaphis* (Fitch)). Gahan (1910) kasnije pridružuje *Adialytus* rodu *Diaeretus* Foerster, pre svega na osnovu nervature prednjih krila. Krilna nervatura vrsta roda *Adialytus* je značajno redukovana, imaju dobro razvijen metakrapus, odnosno nerv – R1, koji predstavlja produžetak stigme. Od ostalih nerava, imaju samo deo nerva RS, takozvani radijalni sektor, dok su svi ostali nervi redukovani. Sa druge strane, predstavnici roda *Lysiphlebus*, pored pomenutih nerava, imaju deo medijalnog nerva – M, kao i poprečni nerv r-m koji spaja nerv RS i M, pri čemu može biti delimično obezbojen (Wharton et al., 1997). Nakon redeskripcije 1967. godine (Starý i Schlinger) *Adialytus* je razmatran u okviru roda *Lysiphlebus*. Konačno, generički status je ustanovljen ponovo u radovima Mackauer i Starý (1967) i Mackauer (1968). Međutim, u kasnijim studijama koje objavljuje Starý (Starý, 1970, 1975) *Adialytus* i dalje ostaje u okviru roda *Lysiphlebus* sa statusom podroda. Štaviše, opisivanjem nove vrste – *Adialytus veronicaecola* (Starý) [tada *Lysiphlebus (Adialytus) veronicaecola*] Starý i Juchnevič (1978) *Adialytus* i dalje zadržava subgenerički status. Godinu kasnije, Starý i Rakauskas (1979) opisuju još jednu novu vrstu, *Adialytus balticus* Starý & Rakauskas pri čemu ovog puta potvrđuju status roda *Adialytus*.

Do sada je poznato ukupno sedam „dobrih“ vrsta ovog roda:

Adialytus ambiguus (Haliday 1834)

Aphidius diminuens Nees 1834

Aphidius exiguus Haliday 1834

Lysiphlebus arvicola Starý 1961

Lysiphlebus crocinus Mackauer 1962

Lysiphlebus mackaueri Starý 1961

Adialytus balticus Starý & Rakauskas 1979

Adialytus fuscicornis (Ashmead 1891)

Lipolexis fuscicornis Ashmead, William H. 1891

Adialytus kaszabi Takada 1979

Adialytus salicaphis (Fitch 1855)

Adialytus tenuis Forster 1862

Aphidius (Diaeretus) laticephalus Telenga 1953

Lipolexis salicaphidis Ashmead 1889

Trioxys populaphis Fitch 1855

Adialytus thelaxis (Starý 1961)

Lysiphlebus thelaxis Starý 1961

Adialytus veronicaecola (Starý 1978)

Lysiphlebus (Adialytus) veronicaecola Starý 1978

Vrsta *A. ambiguus* ima široku rasprostranjenost, do sada je registrovana u celom Holarktiku kao parazitoid vaši iz potfamilije Chaitophorinae. Domaćini pripadaju rodovima: *Sipha* Passerini, *Chaetosiphella* Hille Ris Lambers i *Atheroides* Haliday. Svi ovi rodovi pripadaju istom tribusu – Atherodini syn. Siphini, koji se hrane biljkama iz porodice trava (Poaceae). Pored pomenutih rodova, zabeleženo je da *A. ambiguus* uspešno parazitira i vrstu *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) koja pripada drugoj potfamiliji biljnih vaši – Aphidini (tribus Rhopalosiphina) (Michelena et al., 2004;

Stanković et al., 2013). Ova vrsta vaši se takođe najčešće nalazi na biljkama iz familije Poaceae. Posebnu pažnju treba obratiti na takson „*Lysiphlebus ambiguus*“ (Haliday 1834), koji je prvobitno bio predstavljen holotipom pod imenom „*Aphidius ambiguus*“ Haliday 1834 deponovan u Prirodnjačkom muzeju u Londonu. Deo ovog tipskog materijala morfološki odgovara današnjoj vrsti *Adialytus ambiguus* [prvobitno *Lysiphlebus (Adialytus) ambiguus* (Haliday 1834)]. Međutim, u studiji koju su sproveli Tremblay i Eady (1978) pregledom navedenog materijala, utvrđeno je da tipski materijal sadrži u stvari morfološki različite jedinke. Jedinke koje odgovaraju rodu *Adialytus* (tada sa statusom podroda) su pripadale vrsti *Lysiphlebus (Adialytus) arvicola* Starý 1961, koji danas predstavlja sinonim vrste *A. ambiguus*. S obzirom na to da deo jedinki morfološki odgovara rodu *Lysiphlebus* s. str. Tremblay & Eady dodeljuju vrsti *Lysiphlebus ambiguus* sensu Auct. nec Haliday, novi naziv – *Lysiphlebus confusus* Tremblay & Eady, koji je danas validan.

Adialytus balticus je registrovana samo u istočnom Baltiku, kada je i opisana kao parazitoid vaši *Dysaphis anthrisci* Börner, koje žive na korenu i u bazi stabla biljke *Anthriscus* sp. (Starý i Rakauskas, 1979). Ova vrsta ose za sada postoji samo kao tipski materijal u kolekciji P. Starý (Institut za entomologiju, České Budějovice, Češka Republika).

Adialytus fuscicornis je registrovana samo u Nearktičkoj oblasti kao parazitoid vaši roda *Aphis* (Linnaeus) (Smith, 1944; Pike et al., 2000).

Vrsta *A. kaszabi* je do sada pronađena samo u Mongoliji (Takada, 1979). Vrlo malo literaturnih podataka postoji o ovoj vrsti.

Adialytus salicaphis je relativno česta vrsta u celom Holarktiku. Parazitira veći broj vrsta roda *Chaitophorus* Koch koji pripada potfamiliji Chaitophorinae (tribus Chaitophorini). Vaši ovog roda su vrlo česte na listovima mnogih vrsta vrba i topola. Ova vrsta je prvobitno bila opisana pod imenom *Adialytus tenuis* Forster 1862 na osnovu koje je definisan sam rod, međutim, danas predstavlja sinonim za važeći naziv – *A. salicaphis*.

Adialytus thelaxis je zabeležen u većem delu Azije i Evrope. Opisana je pod imenom *Lysiphlebus telaxis* kao jedini parazitoid ovog roda koji napada vaši iz

ptfamilije Thelaxinae (Starý, 1961). *A. thelaxis* parazitira vrste roda *Thelaxes* Westwood, koje su relativno česte na listovima mnogih vrsta hrastova.

Adialytus veronicaecola je opisana sa prostora Kazahstana kao parazitoid vaši iz roda *Aphis* koje kovrdžaju lišće biljke hraniteljke (*Veronica longifolia*), (Starý and Juchnevič, 1978). Ova vrsta naseljava uglavnom istočni Palearktiki (Yu et al., 2012). *Adialytus veronicaecola* parazitira i neke ekonomski značajne vrste vaši kao što su *Aphis caraccivora* Koch i *A. gossypii* (Rakhshani et al., 2012).

Rod *Lysiphlebia* je relativno mlad rod, ustanovljen je 1967. godine nakon revizije orijentalnih afidiina (Starý i Schlinger, 1967). Tipična vrsta ovog roda je *Lysiphlebia japonica* (Ashmead 1906) koja je prvobitno bila opisana pod imenom *Lysiphlebus japonicus* Ashmead 1906. Pored redeskrpcije pomenute vrste, Starý i Schlinger u svojoj studiji opisuju i novu vrstu iz novoustanovljenog roda pod nazivom *Lysiphlebia rugosa*. Rod *Lysiphlebia* je sličan rodu *Lysiphlebus*, pre svega po obliku legalice i nervaturi prednjih krila. Metakarpus prednjih krila, odnosno nerv R1 je dugačak i proteže se do oboda prednjih krila, deo nerva RS je relativno kratak. Kao i vrste roda *Lysiphlebus*, imaju deo medijalnog nerva – M, a takođe i poprečni nerv r-m koji spaja nerv RS i M. Međutim, razlikuje se po tome što je propodeum sa areolama i u zadnjem delu iskošen nadole, takođe, oblik i struktura prvog tergita je rugozna i obično ima centralni, uzdužni greben. (videti Starý i Schlinger, 1967).

Do sada je opisano pet vrsta:

Lysiphlebia chrysanthemum Dong & Wang 1993

Lysiphlebia japonica (Ashmead 1906)

Lysiphlebus japonicus Ashmead 1906

Lysiphlebia mirzai Shujauddin 1975

Lysiphlebia sacchari Chen 1980

Lysiphlebia jiangchuanensis Wang & Dong 1996

Lysiphlebia rugosa Starý & Schlinger, 1967

Lysiphlebia youyangensis Wang & Dong 1993

Vrste roda *Lysiphlebia* parazitiraju vaši iz rodova *Aphis*, *Brachycaudus* van der Goot, *Rhopalosiphum* Koch, *Schizaphis* Börner, *Sitobion* Mordvilko i druge. Vrsta *L. jiangchuanensis* je zabeležena kao parazitoid vrste *Aphis taraxacicola* (Börner), dok *L. japonica* parazitira vrste *Aphis gossypii*, *Brachycaudus helichrysi* (Kaltenbach), *Hyalopterus pruni* (Geoffroy), *Melanaphis sacchari* (Zehntner), *Schizaphis graminum* (Rondani), *Sitobion miscanthi* (Takahashi) i *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). Vrsta *L. rugosa* je registrovana kao parazitoid vrsta *Aphis glycines* Matsumura i *Brachycaudus helichrysi*. Sve vrste roda *Lysiphlebia* naseljavaju istočne delove Azije (Kina, Japan, Vijetnam, Koreja, istočna Rusija) kao i Indijski potkontinent. Vrsta *L. japonica* je introdukovana u SAD za borbu protiv citrusne vaši *T. citricida* (Michaud, 2002).

Kao što je istaknuto, rod *Adialytus* je nekoliko puta menjao status u okviru podtribusa Lysiphlebina. Pored ovog roda, i rod *Lysiphlebia* je prvobitno razmatran u okviru roda *Lysiphlebus*, sa kojim deli stanje mnogih morfoloških karaktera. Imajući to u vidu, nameće se potreba da se ispituju filogenetski odnosi između ova tri roda. Sva tri roda su morfološki veoma slični, a naročito je evidentna sličnost između rodova *Lysiphlebus* i *Lysiphlebia* koja se ogleda pre svega u nervaturi prednjih krila.

Kada je rod *Adialytus* u pitanju, pored taksonomskog statusa samog roda, nejasan je i status nekih vrsta ovog roda. Usled veoma teške identifikacije vrsta, u literaturi se javlja veći broj sinonima, što je naročito izraženo kod vrsta *A. ambiguus* i *A. salicaphis*. Vrste kao što su *A. balticus* i *A. kaszabi* postoje samo kao tipski materijal, pa je samim tim otežana njihova morfološka analiza, a gotovo je nemoguće izvršiti analizu na molekularnom nivou s obzirom na starost materijala i konzervaciju (čuvaju se ili kao mikroskopski preparati ili suvo preparovani primerci). Vrsta *A. ambiguus* je izuzetno varijabilna. Rakhshani et al., (2012) ističu postojanje dva nova fenotipa u okviru ove vrste; „*A. arvicola*“ i „*A. cf. ambiguus*“. Ova dva fenotipa se razlikuju pre svega na osnovu dužine metakarpusa, odnosno nerva R1. Fenotip „*A. arvicola*“ ima relativno kratak metakarpus u odnosu na uobičajeni fenotip vrste *A. ambiguus*, dok fenotip „*A. cf. ambiguus*“ ima intermedijernu dužinu nerva R1. Oba pomenuta fenotipa su parazitoidi vaši iz roda *Sipha* (Rakhshani et al., 2012). Ova dva pomenuta fenotipa dodatno otežavaju identifikaciju vrsta roda *Adialytus*. Iako je u protekle tri decenije objavljeno nekoliko identifikacionih ključeva za vrste ovog roda (Starý i Rakauskas, 1979; Mescheloff i Rosen, 1990; Rakhshani et al., 2012) deskripcije nekih morfoloških karaktera su vrlo često nejasne ili nedovoljne pri njihovoj identifikaciji.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi ove studije su:

- Utvrđivanje morfološke varijabilnosti vrsta roda *Adialytus* korišćenjem metoda „tradicionalne“ i geometrijske morfometrije.
- Utvrđivanje obrazaca variranja oblika prednjih krila i testiranje validnosti oblika krilne ploče i krilne nervature za identifikaciju vrsta roda *Adialytus*.
- Ispitivanje genetičke intra- i interspecijske varijabilnosti vrsta roda *Adialytus* upotrebom jednog nuklearnog (28S rRNK) i mitohondrijalnog COI gena.
- Utvrđivanje filogenetskih odnosa rodova *Adialytus*, *Lysiphlebus* i *Lysiphlebia* na osnovu 28S rRNK gena.
- Utvrđivanje taksonomskog statusa analiziranih rodova kao i sličnosti i razlika u spektru domaćina.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je obuhvatilo tri najčešće evropske vrste roda *Adialytus*: *A. ambiguus*, *A. salicaphis* i *A. thelaxis*. Sve jedinke su sakupljene u periodu od 1970. do 2013. godine. Prikupljanju osa je prethodilo sakupljanje afidnih domaćina koji su zajedno sa delovima biljaka na kojima su se hranili stavljeni u prozirne plastične čaše zapremine 0,5 litara. Kako bi se sprečio izlazak vaši i osa iz plastičnih čaša, otvor čaša je prekrivan rastegljivom tkaninom (95% poliamid i 5% elastin) koja omogućava ventilaciju. Tako pripremljeni uzorci su čuvani na temperaturi od 23°C i relativnoj vlažnosti od oko 65%, u trajanju od 2-3 nedelje, odnosno do eklozije imaga. Parazitske ose su sakupljane finom četkicom i konzervirane u 96% etil-alkoholu. Pored ovog načina, izvestan broj jedinki starijeg datuma je čuvan u suvom stanju. Takav materijal nije bio pogodan za korišćenje u molekularnim analizama zbog degradacije DNK. Vrsta *Adialytus balticus* nije obuhvaćena ovom analizom zbog nedostatka materijala, kao ni vrste *A. fuscicornis*, *A. kaszabi* i *A. veronicaecola*. Pored roda *Adialytus*, u molekularne analize su uključeni rodovi *Lysiphlebia* sa vrstom *L. japonica* i *Lysiphlebus* sa pet vrsta (*L. cardui*, *L. confusus*, *L. fabarum* (Marshall 1896), *L. fritzmuelleri* i *L. testaceipes*). Analizirane jedinke su sakupljane uglavnom na Evropskom kontinentu (Crna Gora, Češka Republika, Francuska, Grčka, Litvanija, Slovenija, Srbija, Španija, Švajcarska) međutim određen broj jedinki potiče sa Azijskog kontinenta, odnosno iz Irana. Pregled analiziranog materijala je prikazan u Tabelama 1 i 3.

3.1. „Tradicionalna“ morfometrija

Morfometrija predstavlja kvantitativni način opisivanja i poređenja oblika organizama, ili češće njihovih delova i morfoloških celina (Zelditch et al., 2012). „Tradicionalna“ morfometrija se zasniva na jednostavom merenju i analizi linearnih distanci, uglova i površina delova nekog organizma.

Ovom analizom je obuhvaćeno ukupno 228 jedinki iz tri vrste roda *Adialytus*: *A. ambiguus* i *A. salicaphis* su podeljene na po devet setova, odnosno populacija, dok vrsta

A. thelaxis obuhvata četiri (Tabela 1). Na ovom mestu, pod populacijom podrazumevamo set jedinki koje su sakupljene sa istog domaćina, iste biljke i istog datuma.

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

Šifra uzorka	Vrsta	Domaćin	Biljka	Država	Lokalitet	Datum sak.	GM	TM
AaFLL	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>H. murinum</i>	Francuska	Le Luc	26.03.1970.	10	10
AaGrKI	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>H. murinum</i>	Grčka	Kalamata	02.05.2010.	13	15
AaGrKy	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>L. perene</i>	Grčka	Kyparissia	01.05.2010.	15	15
AaMneB	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>H. murinum</i>	Crna Gora	Bar	24.05.2011.	10	10
AaSrbK	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>A. repens</i>	Srbija	Kula	05.07.2009.	8	9
AaSrbLK	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>D. sanguinalis</i>	Srbija	Lebane, Konjino	24.07.2012.	10	10
AaSrbNP	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>Z.mays</i>	Srbija	Niš, Popovac	13.07.2012.	10	10
AaSrbTB	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Plantago</i> sp.	Srbija	Tošin bunar	26.05.2002.	12	12
AaSrbTD	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>A. elatior</i>	Srbija	Tara, kanjon Dervente	03.07.2012.	10	10
AsCzCB	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>Salix</i> sp.	Češka	Češke Budějovice	19.06.1977.	10	10
AsFA	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. niger</i>	<i>Salix</i> sp.	Francuska	Antibes	23.05.1973.	10	10
AsIrnSh	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. saljaponicus</i>	<i>S. alba</i>	Iran	Shirvan	24.03.2007.	14	15
AsSrbD	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>S. caprea</i>	Srbija	Dukat planina	06.08.2011.	10	10
AsSrbNPPa	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	25.05.2010.	15	15
AsSrbNPPall	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>P. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	29.05.2011.	11	11
AsSrbNPSf	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. niger</i>	<i>S. fragilis</i>	Srbija	Niš, Popovac	04.07.2010.	9	9
AsSrbStM	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salicti</i>	<i>S. caprea</i>	Srbija	Stara planina, Babin zub	07.07.2010.	10	10
AsSrbV	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salicti</i>	<i>S. caprea</i>	Srbija	Vlasina	06.08.2010.	10	10
AtIrnQ	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. castaniifolia</i>	Iran		04.06.2012.	7	4
AtMNB	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ilex</i>	Crna Gora	Bečići	29.06.2001.	9	0
AtSrbNSJ	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Niš, manastir Sv. Jovan	03.06.2010.	9	8
AtSrbLb	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Lebane, Konjino	01.06.2013.	15	15

Da bi se pristupilo merenju i brojanju karaktera, pravljene su trajni mikroskopski preparati disekovanih jedinki afidiina u Berlezovom rastvoru. Procedura prepariranja jedinki je sledeća:

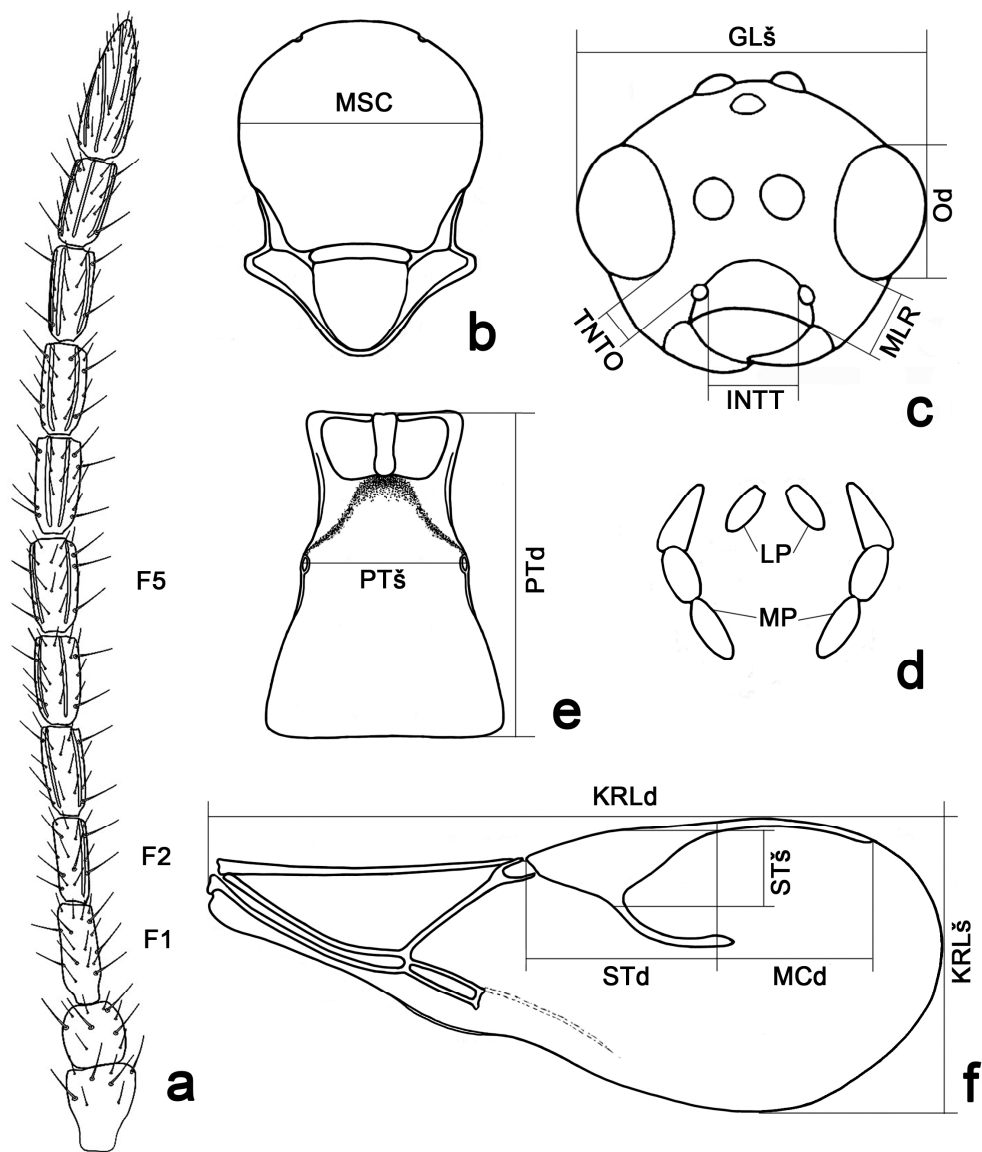
- Jedinke su potapane u 10% rastvor kalijum-hidroksida (KOH) na 30 minuta.
- Uz pomoć fine pincete i entomološke igle su odstranjena krila koja su direktno uvedena u 70% etil-alkohol.
- Ostatak tela je kuvan u 10% rastvoru KOH 5 minuta na 90-100°C.
- Disekcija jedinki je vršena pod binokularnom lupom, tako što su odvajani delovi tela: antene, glava, mezoskutum, propodeum, petiolus i legalica.
- Delovi tela su zatim sprovedeni kroz seriju razblaženja etil-alkohola rastuće koncentracije počevši sa 3 minuta u 70% etil-alkoholu, po 10 minuta u 80% etil-alkoholu, zatim u 96% etil-alkoholu i na kraju u 99,6% etil-alkoholu
- Dehidrirani delovi tela su montirani na predmetna stakla u kapi Berlezovog rastvora.
- Nakon 24-48h dodavano je još Berlezovog rastvora i prekrivano pokrovnim staklom.
- Tako pripremljeni preparati su sušeni 30 dana na sobnoj temperaturi.
- Merenje karaktera je izvršeno pomoću mikroskopa marke Leica DM 1000 i odgovarajućeg softvera (Leica Application Suite; Version 2.5.0 R1). Analizirani karakteri su prikazani na Slici 2, dok je kompletan spisak karaktera prikazan u Tabeli 2.

Tabela 2. Spisak karaktera koji su analizirani tradicionalnim morfometrijskim metodama.

ŠIFRA KARAKTERA	OPIS KARAKTERA	TIP KARAKTERA
MP	Broj segmenata maksilarnih palpusa	Meristički
LP	Broj segmenata labijalnih palpusa	Meristički
F1rn	Broj mirisnih brazdi na prvom flagelarnom članku	Meristički
F2rn	Broj mirisnih brazdi na drugom flagelarnom članku	Meristički
F5rn	Broj mirisnih brazdi na petom flagelarnom članku	Meristički
GLš	Širina glave	Kontinuirani
Od	Dužina oka	Kontinuirani
MLR	Malarno rastojanje	Kontinuirani
INTT	Intertentorijalno rastojanje	Kontinuirani
TNTO	Tentoriokularno rastojanje	Kontinuirani
F1d	Dužina prvog flagelarnog članka	Kontinuirani
F1š	Širina prvog flagelarnog članka	Kontinuirani
F2d	Dužina drugog flagelarnog članka	Kontinuirani
F2š	Širina drugog flagelarnog članka	Kontinuirani
F5d	Dužina petog flagelarnog članka	Kontinuirani
F5š	Širina petog flagelarnog članka	Kontinuirani
MSCš	Širina mezoskutuma	Kontinuirani
KRLd	Dužina krila	Kontinuirani
KRLš	Širina krila	Kontinuirani
STd	Dužina stigme	Kontinuirani
STš	Širina stigme	Kontinuirani
MCd	Dužina metakarpusa	Kontinuirani
PTd	Dužina petiolusa	Kontinuirani
PTš	Širina petiolusa	Kontinuirani

Ukupno su analizirana 24 karaktera, od toga je 19 kontinuiranog tipa, dok je 5 merističkog tipa (Tabela 2). Većina analiziranih karaktera je korišćena u taksonomskim ključevima za diskriminaciju kako na generičkom tako i na specijskom nivou (Starý, 1975; Mescheloff i Rosen, 1990). S obzirom na to da veličina tela parazitoida zavisi pre svega od veličine tela samog domaćina (Cohen et al., 2005), u statističkim analizama su korišćene relativne dužine tj. odnosi dužina karaktera. Sledeći odnosi karaktera su korišćeni u ovom radu: TNTO/INTT, MLR/Od, F1š/F1d, F2š/F2d, F5š/F5d, MSCš/GLš, PTš/PTd, KRLš/KRLd, STš/STd, MCd/STd.

Sve jedinke su grupisane u tri grupe, odnosno vrste koje su prethodno determinisane uz pomoć ključeva i poznavanja afidnog domaćina. Statističke analize obuhvatale su deskriptivnu statistiku kao i analizu varijabilnosti karaktera pomoću više bivarijantnih i multivarijantnih metoda. Analize su izvršene pomoću programskog paketa Statistica (StatSoft, Inc. 7.0).



Slika 2. Delovi tela *Adialytus* sp.: **a)** Antena; F1 – prvi flagelarni članak, F2 – drugi flagelarni članak, F5 – peti flagelarni članak. **b)** Mezoskutum; MSC – širina mezoskutuma. **c)** Glava; GLš – širina glave, Od – dužina oka, TNTO – tentoriokularno rastojanje, INTT – intertentorijalno rastojanje, MLR – malarno rastojanje. **d)** LP – labijalni palpusi, MP – maksilarni palpusi. **f)** Prednje krilo; KRLd – dužina krila, KRLš – širina krila, STd – dužina stigme, STš – širina stigme, MCd – dužina metakrpusa (R1 nerva).

3.2. Geometrijska morfometrija

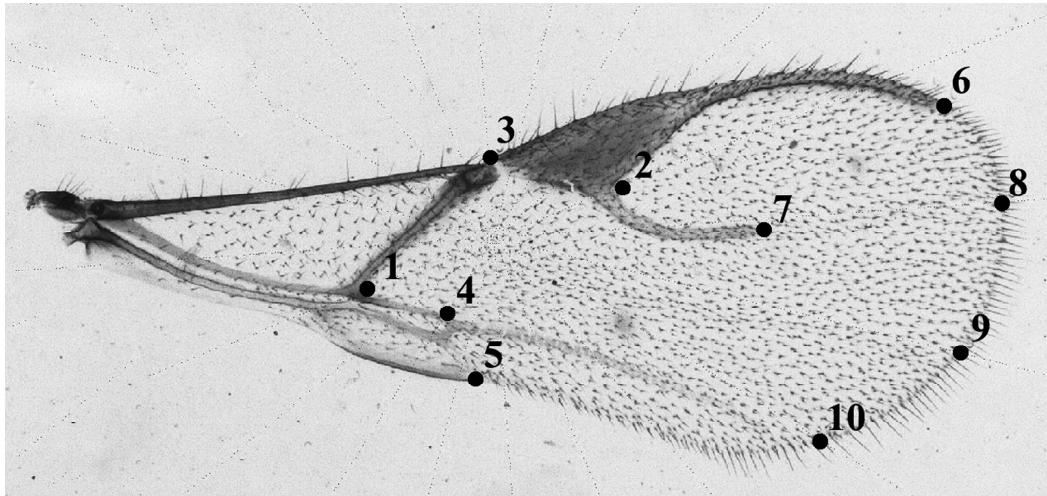
Geometrijskom morfometrijom možemo analizirati oblik, nezavisno od veličine odabranog karaktera ili celog objekta, ili njegove orijentacije. Na taj način geometrijska informacija nekog objekta ostaje nepromenljiva u odnosu na translaciju, rotaciju i promenu veličine. U biologiji, geometrijska morfometrija se može posmatrati kao statistička metoda za analizu razlika u obliku neke morfološke strukture kod različitih jedinki (Rohlf i Marcus, 1993).

Krila insekata su veoma pogodan objekt za geometrijsku morfometriju, pre svega zbog mogućnosti lakog postavljanja homologih tačaka na krilnu nervaturu, a zatim i zbog njihove dvodimenzionalnosti i providnosti, što znatno olakšava pripremu samog materijala i pouzdanost analize.

Geometrijska morfometrija se zasniva na konstelaciji odnosno identifikaciji homologih tačaka – *landmarks*, tj. njihovih X i Y koordinata strukture koja se analizira. Dobijene koordinate služe za kvantifikaciju oblika analiziranog objekta. Da bismo analizirali varijabilnost oblika, neophodno je eliminisati razlike u veličini, položaju objekta i njegovoj orijentaciji. To se postiže skaliranjem na jednu standardnu veličinu, zatim translacijom tj. preklapanjem i postavljanjem na jednu standardnu poziciju i na kraju rotacijom kako bi svi objekti zauzeli standardnu orijentaciju.

Analiza varijacija u obliku krila je izvršena koristeći samo desna krila ženki triju vrsta roda *Adialytus*. Geometrijskom morfometrijskom analizom je obuhvaćeno 237 jedinki koje su grupisane u 22 populacije. Po devet populacija pripada vrstama *A. ambiguus* i *A. salicaphis*, dok četiri pripada vrsti *A. thelaxis*. U uzorku je bilo 7-15 jedinki po analiziranoj populaciji (Tabela 1.). Sva krila, nakon prethodno opisanog prepariranja i montiranja na mikroskopske pločice, su fotografisana na mikroskopu marke Leica DM 1000 uz pomoć digitalne kamere Leica DFC 290 (Leica Microsystems[©]) na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu. Na krilnoj ploči je izabrano ukupno deset homologih tačaka, koje su u literaturi poznate pod nazivom „landmarks“ (Bookstein, 1997a; Zelditch et al., 2012). Pozicija definisanih tačaka je prikazana na Slici 3. S obzirom na to da vrste roda *Adialytus* imaju veoma redukovanu krilnu nervaturu, neophodna je upotreba i pomoćnih tačaka tzv. „polutačaka“, odnosno „semilandmarks“. Tačke od 1-7 pripadaju grupi landmarks i postavljane su u odnosu na nervaturu krila. Međutim, tačke od 8 do 10 su prema tipu semilandmarks, one su

postavljane na preseku pomoćnih linija i krilne ploče (Slika 3). Oba tipa tačaka su digitalizovane uz pomoć softvera TpsDig2 (Rohlf, 2005). Postavljanju tačaka je prethodila obrada krila koristeći programski paket MakeFan6 (Sheets, 2003), pri čemu su preko krila iscrtane linije u obliku zvezde koje služe za konzistentno postavljanje semilandmarks na jednakom ugaonom rastojanju.



Slika 3. Položaj homologičnih tačaka na krilnoj ploči (*A. ambiguus*). Tačke 1-7 predstavljaju „landmarks“. Tačke 8-10 su postavljene u preseku isprekidanih linija i oboda krila i predstavljaju „semilandmarks“.

Za analiziranje varijabilnosti u obliku, nakon eliminacije razlika u veličini, položaju i orijentaciji, primenjena je GLS metoda (Generalized Least Squares Procrustes superimposition) koja zadržava sve informacije vezane za varijabilnost u obliku unutar analiziranog uzorka (Bookstein, 1997b). Mera veličine je procenjena preko veličine centroida “centroid size” (CS), koja predstavlja geometrijsku meru veličine. CS se za svako krilo izračunava kao kvadratni koren sume kvadratnih rastojanja svake tačke od težišta cele konfiguracije (Dryden i Mardia, 1998).

Kvantifikacija varijabilnosti oblika kao i ilustracija promena u obliku morfološke strukture postignuta je primenom „thin-plate spline“ tehnike, koja pomoću deformacija zamišljene, beskonačno tanke metalne ploče omogućava izračunavanje varijabilnosti oblika kao i vizualizaciju promena oblika. Varijabilnost u obliku i veličini krila je ispitana analizom glavnih komponenti (PCA). Razlike u veličini krila između grupa su zatim ispitane primenom analize varijanse (ANOVA) na CS, a razlike u obliku krila primenom multivarijantne analize varijanse (MANOVA) sa svim varijablama oblika kao

zavisno promenljivim. Za analizu varijabilnosti u obliku krila kao varijable oblika korišćene su sopstvene vrednosti glavnih komponenti (PC scores). Za utvrđivanje strukture i stepena razlika u obliku između *a priori* definisanih grupa primenjena je kanonijska varijatna analiza – Canonical Variate Analysis (CVA) na svim PC skorovima.

Analiza i vizualizacija promena u obliku krila koje su opisane kanonijskim osama je urađena koristeći programski paket MorphoJ (Klingenberg, 2011). Takođe, ovaj softver je korišćen i za dobijanje PC skorova kao i veličinu centroida (CS). Sve statističke analize su urađene u programu Statistica (StatSoft, Inc. 7.0).

3.3. Molekularne analize

Molekularnim analizama ukupno je obuhvaćena 91 jedinka. Analizirane su sekvence dva gena: mtCOI i 28S rRNK, na osnovu kojih su rekonstruisani filogenetski odnosi u okviru samog roda *Adialytus*, ali i odnosi između rodova u okviru podtribusa Lysiphlebina.

Analiza interspecijskih odnosa i varijabilnosti u okviru roda *Adialytus* izvršena je na osnovu parcijalnih sekvenci mitohondrijalnog gena za citohrom oxidazu 1 (COI). U analizu je uključeno 65 jedinki (Tabela 3).

Tabela 3. Spisak uzoraka analiziranih vrsta molekularnim metodama.

Haplotip	Šifra	Vrsta	Domaćin	Biljka	Država	Lokaliet	Datum
Jedinke korišćene u anlizi mitohondrijalnog gena za COI							
A1	Q62	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>D. glomerata</i>	Srbija	Vlasina	28.06.2012.
A2	Q5	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>A. repens</i>	Srbija	Kula	05.07.2009.
A2	Q6	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>A. repens</i>	Srbija	Kula	05.07.2009.
A2	Q7	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>A. repens</i>	Srbija	Kula	05.07.2009.
A2	Q66	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>Z. mays</i>	Srbija	Niš, Popovac	13.07.2012.
A3	Q101	" <i>A. arvicola</i> "	Malezova klopka	-	Iran	Qazvin, Koohin	25.5-8.6.2011.
A4	Q80	" <i>A. arvicola</i> "	<i>S. flava</i>	<i>A. repens</i>	Iran	Kermanshah	25.06.2011.
A4	Q81	" <i>A. arvicola</i> "	<i>S. flava</i>	<i>A. repens</i>	Iran	Kermanshah	25.06.2011.
A4	Q102	" <i>A. arvicola</i> "	Malezova klopka	-	Iran	Qazvin, Koohin	2011
A5	Q70	" <i>A. cf. ambiguus</i> "	<i>S. elegans</i>	<i>T. aestivum</i>	Iran	Mashhad	12.04.2012.
A5	Q71	" <i>A. cf. ambiguus</i> "	<i>S. elegans</i>	<i>T. aestivum</i>	Iran	Mashhad	12.04.2012.
A5	Q72	" <i>A. cf. ambiguus</i> "	<i>S. elegans</i>	<i>T. aestivum</i>	Iran	Mashhad	12.04.2012.
A6	Q18	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>H. murinum</i>	Grčka	Kalamata	02.05.2010.
A6	Q56	<i>A. "arvicola"</i>	<i>S. maydis</i>	<i>P. pratensis</i>	Litvanija	Punciai	18.07.2011.
A7	Q64	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>A. elatior</i>	Srbija	Tara, Perućac	03.07.2012.
A7	Q65	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>A. elatior</i>	Srbija	Tara, Perućac	03.07.2012.
A8	Q15	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>L. perene</i>	Grčka	Kyparissia	01.05.2010.
A8	Q16	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>L. perene</i>	Grčka	Kyparissia	01.05.2010.
A8	Q17	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>L. perene</i>	Grčka	Kyparissia	01.05.2010.
A8	Q43	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>B. tectorum</i>	Iran	Mane	-
A8	Q44	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>B. tectorum</i>	Iran	Mane	-
A8	Q45	<i>A. ambiguus</i>	<i>S. maydis</i>	<i>B. tectorum</i>	Iran	Mane	-
A8	Q50	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>H. murinum</i>	Crna Gora	Bar	24.05.2011.
A8	Q51	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>H. murinum</i>	Crna Gora	Bar	24.05.2011.
A8	Q57	<i>A. "arvicola"</i>	<i>S. maydis</i>	<i>P. pratensis</i>	Litvanija	Punciai	18.07.2011.
A8	Q67	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>Z. mays</i>	Srbija	Niš, Popovac	13.07.2012.
A9	Q73	" <i>A. cf. ambiguus</i> "	<i>Sipha</i> sp.	<i>Hordeum</i> sp.	Iran	Isfehan	13.11.2010.
A9	Q74	" <i>A. cf. ambiguus</i> "	<i>Sipha</i> sp.	<i>Hordeum</i> sp.	Iran	Isfehan	13.11.2010.
A9	Q75	" <i>A. cf. ambiguus</i> "	<i>S. elegans</i>	<i>G. phleoides</i>	Iran	Isfehan	13.11.2010.
S1	Q28	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salicti</i>	<i>S. caprea</i>	Srbija	Vlasina	06.08.2010.
S1	Q29	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salicti</i>	<i>S. caprea</i>	Srbija	Vlasina	06.08.2010.
S1	Q30	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salicti</i>	<i>S. caprea</i>	Srbija	Vlasina	06.08.2010.
S1	Q31	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salicti</i>	<i>S. caprea</i>	Srbija	Stara planina, Babin zub	07.07.2010.
S1	Q33	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. niger</i>	<i>S. fragilis</i>	Srbija	Niš, Popovac	04.07.2010.
S1	Q34	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. niger</i>	<i>S. fragilis</i>	Srbija	Niš, Popovac	04.07.2010.
S1	Q35	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. niger</i>	<i>S. fragilis</i>	Srbija	Niš, Popovac	04.07.2010.
S2	Q98	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Španija	Leida	14.06.2011.
S2	Q100	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Španija	Leida	14.06.2011.
S3	Q32	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salicti</i>	<i>S. caprea</i>	Srbija	Stara planina, Babin zub	07.07.2010.
S3	Q97	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. vitellinae</i>	<i>S. alba</i>	Slovenija	Zbilje	14.07.2009.
S4	Q37	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	25.05.2010.
S4	Q38	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	25.05.2010.
S4	Q39	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	25.05.2010.
S4	Q52	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>P. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	29.05.2011.
S4	Q53	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>P. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	29.05.2011.
S4	Q54	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>S. caprea</i>	Srbija	Dukat planina	06.08.2011.
S5	Q95	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. vitellinae</i>	<i>S. alba</i>	Slovenija	Zbilje	14.07.2009.
S6	Q40	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salijaponicus</i>	<i>S. alba</i>	Iran	Shirvan	-
S6	Q41	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salijaponicus</i>	<i>S. alba</i>	Iran	Shirvan	-
S6	Q42	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. salijaponicus</i>	<i>S. alba</i>	Iran	Shirvan	-
S6	Q85	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>S. alba</i>	Iran	Isfehan	29.10.2010.
S6	Q106	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Iran	Karadj	09.10.2002.
S7	Q94	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. leucomelas</i>	<i>Populus</i> sp.	Slovenija	Zbilje	14.07.2009.
S8	Q47	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>Salix</i> sp.	Češka	N. Dvur, Silesia	15.06.2010.
S8	Q84	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>S. alba</i>	Iran	Isfehan	29.10.2010.
S8	Q92	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. leucomelas</i>	<i>Populus</i> sp.	Slovenija	Zbilje	14.07.2009.
S8	Q104	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Iran	Tehran	25.11.2002.
S8	Q105	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Iran	Tehran	25.11.2002.
T1	Q109	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Lebane, Konjino	01.06.2013.
T2	Q24	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Niš, manastir S.J.	03.06.2010.
T2	Q25	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Niš, manastir S. J.	03.06.2010.

Tabela 3. Nastavak. Spisak uzoraka analiziranih vrsta molekularnim metodama.

Haplotip	Šifra	Vrsta	Domaćin	Biljka	Država	Lokaliet	Datum
T2	Q26	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Niš, manastir S. J.	03.06.2010.
T2	Q27	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Niš, manastir S. J.	03.06.2010.
T2	Q107	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Lebane, Konjino	01.06.2013.
T2	Q108	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Lebane, Konjino	01.06.2013.
Jedinke korišćene u analizi ribozomalnog gena za 28S rRNK							
SA1	QS79	" <i>A. arvicola</i> "	<i>S. flava</i>	<i>A. repens</i>	Iran	Kermanshah	25.06.2011.
SA1	QS15	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Lebane	01.06.2013.
SA1	QS16	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Lebane	01.06.2013.
SA1	QS17	<i>A. thelaxis</i>	<i>Thelaxes</i> sp.	<i>Q. ceris</i>	Srbija	Lebane	01.06.2013.
SA1	QS18	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>A. elatior</i>	Srbija	Tara, Perućac	03.07.2012.
SA1	QS19	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>A. elatior</i>	Srbija	Tara, Perućac	03.07.2012.
SA1	QS20	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>Z. mays</i>	Srbija	Niš, Popovac	13.7.2012.
SA1	QS21	<i>A. ambiguus</i>	<i>Sipha</i> sp.	<i>Z. mays</i>	Srbija	Niš, Popovac	13.7.2012.
SA2	QS93	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. leucomelas</i>	<i>Populus</i> sp.	Slovenija	Zbilje	14.07.2009.
SA3	QS99	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Španija	Leida	14.06.2011.
SA3	QS104	<i>A. salicaphis</i>	<i>Ch. populeti</i>	<i>P. alba</i>	Iran	Tehran	25.11.2002.
SA3	QS22	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>S. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	08.06.2013.
SA3	QS23	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>S. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	08.06.2013.
SA3	QS24	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>P. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	23.06.2012.
SA3	QS25	<i>A. salicaphis</i>	<i>Chaitophorus</i> sp.	<i>P. alba</i>	Srbija	Niš, Popovac	23.06.2012.
L1	Lfm6	<i>L. fritzmuelleri</i>	<i>A. cracca</i>	<i>V. cracca</i>	Srbija	Vlasina	11.08.2006.
L1	ST2-1	<i>L. testaceipes</i>	<i>A. gossypii</i>	<i>C. aurantifolia</i>	Crna Gora	Bar	24.05.2011.
L2	LF-1	<i>L. fabarum</i>	<i>Protaphis</i> sp.	<i>A. absinthum</i>	Iran	Rasht	
L2	R6-1	<i>L. fabarum</i>	<i>A. saliviae</i>	<i>S. pratensis</i>	Švajcarska	Niederwen	14.05.2011.
L2	B07-02	<i>L. fabarum</i>	<i>A. fabae</i>	<i>Ch. album</i>	Srbija	-	29.05.2007.
L2	B08-10	<i>L. confusus</i>	<i>A. ruborum</i>	<i>R. caesius</i>	Srbija	-	25.05.2008.
L3	R3-1	<i>L. cardui</i>	<i>A. farinosa</i>	<i>S. fragilis</i>	Litvanija	Vilnius	03.07.2011.
L3	B07-04	<i>L. cardui</i>	<i>A. fabae</i>	<i>Ch. album</i>	Srbija	--	29.05.2007.
L3	R8-2	<i>L. confusus</i>	<i>A. schneideri</i>	<i>R. ruborum</i>	Švajcarska	Steinwanz	30.06.2011.
L3	R9-2	<i>L. confusus</i>	<i>A. farinosa</i>	<i>S. fragilis</i>	Litvanija	Vilnius, Bot. Garden	05.07.2011.
Lj	Lj3	<i>L. japonica</i>	Stary Lab. culture	-	Češka	-	-

U cilju rasvetljavanja relacija na generičkom nivou u okviru podtribusa Lysiphlebina, korišćene su parcijalne sekvence gena za 28S rRNK. Ovaj deo molekularne analize obuhvata sva tri roda podtribusa Lysiphlebina. Tri vrste roda *Adialytus* su analizirane sa ukupno 15 jedinki, iz roda *Lysiphlebus* je analizirano pet vrsta (*L. cardui*, *L. confusus*, *L. fabarum*, *L. fritzmuelleri* i *L. testaceipes*) sa ukupno 10 jedinki. Samo jedna jedinka je korišćena iz roda *Lysiphlebia* koja pripada vrsti *L. japonica* (Tabela 3).

Ekstrakcija ukupne DNK svake od analiziranih individua izvršena je pomoću KAPA Express Extract Kit-a prema sledećem protokolu:

U tubici od 0,2 ml je pomešano 2 µl KAPA Express Extract enzima, 10 µl 10x KAPA Express Extract pufera, i 38 µl H₂O (molecular biology grade) i izvorteksovano.

Jedinke su postavljane na sterilno predmetno staklo, a zatim je pod binokularnom lupom napravljeno nekoliko perforacija na toraksu i abdomenu uz pomoć sterilne entomološke igle.

Tako pripremljena osa je ubačena u prethodno pripremljenu tubicu sa miksom za ekstrakciju i sve zajedno izvorteksovano.

Sve tubice su stavljene u Termocycler (Eppendorf Mastercycler[®]) prema sledećem protokolu:

75°C → 10 min

95°C → 5 min

Nakon protokola ekstrakcije, tubice su dobro izvorteksovane i iscentrifugirane u trajanju od jednog minunta na maksimalnom broju obrtaja.

Pipetom, uz pomoću filter-nastavaka, supernatant (u kome je rastvorena DNK) je prebačen u tubice od 1,5 ml i takva DNK je ili direktno korišćena u PCR reakcijama ili čuvana u zamrzivaču na -20°C.

U cilju eliminisanja eventualne kontaminacije, pri svakoj ekstrakciji, na svakih 10 uzoraka, korišćena je negativna kontrola. Negativnu kontrolu je predstavljala dodatna tubica sa svim potrebnim reagensima za ekstrakciju u koju je umesto uzorka, odnosno jedinke, uronjena prethodno sterilisana igla po proceduri koja je primenjivana za standardnu sterilizaciju između uzoraka. Sa negativnim kontrolama nadalje je postupano isto kao i sa uzorcima, da bi se eliminisala eventualna nova kontaminacija.

Umnoženi su delovi gena mtCOI i 28S rRNK. Za amplifikaciju navedenih molekularnih markera korišćeni su različiti protokoli.

Deo gena za subjedinicu 1 citohrom oksidaze je umnožen pomoću prajmera:

LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')

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

Pomoću ovih prajmera kod afidiina se umnožava produkt veličine oko 670 bp (Slika 4).



Slika 4. Deo gena za COI koji se umnožava pomoću prajmera LCO1490 i HCO2198.

PCR amplifikacija DNK je urađena u zapremini od 25 μ l, koja sadrži 1 μ l izolovane 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 od prajmera i 9 μ l vode.

Amplifikacija je vršena u Eppendorf Mastercycler[®]-u po sledećem protokolu:

I 5' 95°C – inicijalna denaturacija

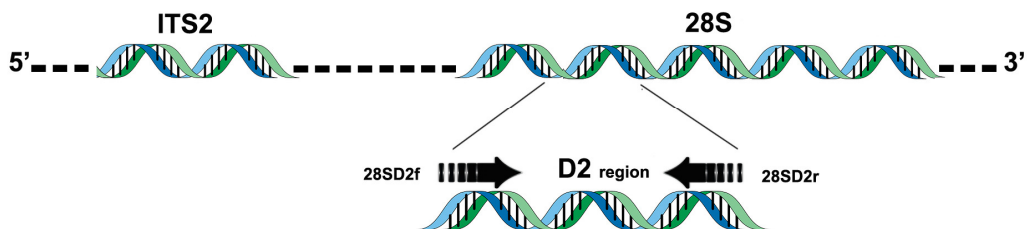
II 1.	1'	94°C	} 35 ciklusa
2.	1'	54°C	
3.	1'30"	72°C	

III 7' 72°C – finalna ekstenzija

Fragmenti nuklearnog gena 28S rRNK, D2 region (Slika 5) su umnoženi korišćenjem prajmera:

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

28S rRNKD2r (5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG-3') (Campbell et al., 1994)



Slika 5. Deo gena za 28S rRNK koji se umnožava pomoću prajmera 28S rRNKD2f i 28S rRNKD2r.

PCR reakcije su urađene u zapremini od 20 μ l koja sadrži 1 μ l izolovane DNK, 14.35 μ l vode, 2 μ l pufera A (High Yield Reaction) sa 1xMg, 1,5 μ l $MgCl_2$ (2,25 mM), 0,5 μ l dNTP (0,25 mM), po 1 μ l svakog od navedenih prajmera (0,5 μ M) i 0,15 μ l KAPATaq DNK polimeraze (0,0375 U/ μ l) (Kapa Biosystems Inc., USA).

Amplifikacija je vršena u Eppendorf Mastercycler[®]-u po sledećem protokolu:

I 3' 95°C – inicijalna denaturacija

II 1.	30"	95°C	} 30 ciklusa
2.	30"	48°C	
3.	2'	72°C	

III 10' 72°C – finalna ekstenzija

Provera uspešnosti amplifikacije (za oba genska markera), kao i eventualne kontaminacije, je urađena tako što je 5 μ l PCR produkta svakog uzorka pušteno na 1% agaroznom gelu prethodno obojenim Midori-greenom (Nippon Genetics) i vizualizirano pod UV transiluminatorom.

Prečišćavanje amplifikovanih uzoraka izvršeno je pomoću QIAGEN QIAquick[®] PCR Purification Kit-a prema uputstvu proizvođača. Provera čistoće prečišćenih uzoraka takođe je izvršena pomoću horizontalne elektroforeze (na 1% agaroznom gelu). Kvantifikacija prečišćenih PCR produkata izvršena je vizuelnim poređenjem sa markerom SERVA DNA 100 Bp DNA Ladder. Reakcije sekvenciranja su urađene u Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

Dobijene sekvence su pregledane i uređene pomoću programa FinchTV (Geospiza, Inc., Seattle, WA) i tako pripremljene za poravnanje koje je urađeno pomoću Clustal *W* programa koji je deo MEGA 5.2 programskog paketa (Tamura et al., 2011). Za izračunavanje prosečnih genetičkih distanci korišćena je dvoparametarska procedura supstitucije baza uz pomoć „bootstrap“ metode sa 1000 ponavljanja. Filogenetski odnosi su rekonstruisani metodama „Maximum Likelihood“ (ML) i „Maximum Parsimony“ (MP) koje su deo programskog paketa MEGA 5.2. U navedenom softveru je izvršena procena najboljeg modela za filogenetsku rekonstrukciju ML metodom. Hasegawa-Kishino-Yano model sa gama distribucijom (Gamma Distributed) je korišćen za filogenetsku rekonstrukciju ML metodom u analizi sekvenci mtCOI gena, dok je u analizi sekvenci gena 28S rRNK korišćen Tamura troparametarski model. Za procenu podrške svake od grana na dobijenim stablima, korišćena je „bootstrap“ metoda sa 1000 ponavljanja.

4. REZULTATI

4.1. „Tradicionalna“ morfometrija

Tradicionalne morfometrijske analize su obuhvatile ukupno 228 jedinki. Od tog broja, 101 jedinka je identifikovana kao *A. ambiguus*, 100 kao *A. salicaphis*, dok je 27 jedinki pripadalo vrsti *A. thelaxis*. Jedinke su analizirane prema specijskoj pripadnosti.

Izračunate su srednja vrednost, varijansa, standardna devijacija, standardna greška, minimum i maksimum za ceo uzorak (Tabela 4), ali i za svaku grupu ponaosob (Tabela 5-17). Meristički karakteri su analizirani kao celi brojevi, odnosno izbrojane vrednosti, dok su kontinuirani karakteri analizirani kao odnosi dimenzija dva karaktera.

Tabela 4. Vrednosti deskriptivne statistike za 15 karaktera urađene na celom uzorku.

	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
MP	228	3,0000	3,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000
LP	228	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
F1rn	228	0,9254	0,0000	4,0000	1,0473	1,0234	0,0678
F2rn	228	1,5307	0,0000	5,0000	1,2105	1,1002	0,0729
F5rn	228	3,3596	1,0000	7,0000	0,6542	0,8088	0,0536
TNTO/INTT	228	0,5687	0,4054	0,7759	0,0059	0,0765	0,0051
MLR/Od	228	0,2970	0,1742	0,4595	0,0023	0,0475	0,0031
F1š/F1d	228	0,4039	0,2857	0,5660	0,0026	0,0512	0,0034
F2š/F2d	228	0,4470	0,3333	0,6531	0,0033	0,0573	0,0038
F5š/F5d	228	0,5119	0,4200	0,7000	0,0025	0,0502	0,0033
MSCš/GLš	228	0,7659	0,6464	0,9333	0,0030	0,0548	0,0036
PTš/PTd	228	0,4461	0,3419	0,6154	0,0022	0,0472	0,0031
KRLš/KRLd	228	0,3869	0,3158	0,4615	0,0012	0,0343	0,0023
STš/STd	228	0,3333	0,2167	0,4372	0,0022	0,0469	0,0031
MCd/STd	228	1,0485	0,5091	1,6358	0,0642	0,2535	0,0168

Iz priložene tabele se može primetiti da je broj segmenata maksilarnih i labijalnih palpusa konstantan u svim grupama tj. sve analizirane jedinke imaju maskilarne palpuse sastavljene od 3 segmenta i labiojialne od jednog. Ostali meristički karakteri koji se odnose na broj mirisnih brazdi na prvom, drugom i petom antenalnom

članku pokazuju veoma veliku varijabilnost. Od kontinuiranih karaktera, najveću varijansu ima odnos dužina metakarpusa i stigme (0,0642). Ostali karakteri kontinuiranog tipa imaju relativno nisku varijabilnost.

Deskriptivna statistika je urađena za sve grupe odvojeno, kako bi se utvrdila unutargrupna varijabilnost analiziranih karaktera. U sledećim tabelama biće predstavljene vrednosti pomenutih statističkih parametara za svaki od analiziranih karaktera posebno za svaku od grupa, odnosno analiziranih vrsta. Od merističkih karaktera, broj maksilarnih i labijalnih palpusa nije prikazan, s obzirom na to da nema variranja ovih karaktera.

Tabela 5. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter F1rn, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,0495	0,0000	1,0000	0,0475	0,2180	0,0217
<i>A. salicaphis</i>	100	1,3500	0,0000	2,0000	0,4318	0,6571	0,0657
<i>A. thelaxis</i>	27	2,6296	1,0000	4,0000	0,6268	0,7917	0,1524
Ceo uzorak	228	0,9254	0,0000	4,0000	1,0473	1,0234	0,0678

Broj mirisnih brazdi na prvom flagelarnom segmentu antena (F1rn) pokazuje visoku varijabilnost, naročito za vrstu *A. thelaxis* (0,6268) gde je raspon ovog merističkog karaktera od 1 do 4. Nešto manju varijansu za ovaj karakter ima vrsta *A. salicaphis* (0,4318) sa rasponom variranja od 0 do 2, dok je relativno niska varijabilnost zabeležena kod jedinki vrste *A. ambiguus* (Tabela 5).

Tabela 6. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter F2rn, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,7426	0,0000	2,0000	0,3131	0,5595	0,0557
<i>A. salicaphis</i>	100	1,8100	0,0000	3,0000	0,6403	0,8002	0,0800
<i>A. thelaxis</i>	27	3,4444	2,0000	5,0000	0,4103	0,6405	0,1233
Ceo uzorak	228	1,5307	0,0000	5,0000	1,2105	1,1002	0,0729

Karakter F2rn (broj mirisnih brazdi na drugom flagelarnom segmentu antena) ima najveću varijabilnost, kako za ceo uzorak, tako i u okviru svake od grupa odnosno vrsta. Vrsta *A. salicaphis* pokazuje najveću varijabilnost za ovaj karakter (varijansa = 0,6403), ostale dve vrste imaju nešto manju varijabilnost (Tabela 6). Najveći broj mirisnih brazdi je registrovan kod vrste *A. thelaxis* i kreće se u rasponu od 2 do 5.

Tabela 7. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter F5rn, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	3,0693	2,0000	4,0000	0,2051	0,4529	0,0451
<i>A. salicaphis</i>	100	3,2600	1,0000	5,0000	0,4772	0,6908	0,0691
<i>A. thelaxis</i>	27	4,8148	4,0000	7,0000	0,5413	0,7357	0,1416
Ceo uzorak	228	3,3596	1,0000	7,0000	0,6542	0,8088	0,0536

Veoma slična situacija je i za poslednji meristički karakter – broj mirisnih brazdi na petom flagelarnom segmentu antena (F5rn). Relativno visoka varijansa za svaku od vrsta, kao i za celokupan uzorak (Tabela 7). Kao i za prethodni karakter, i ovde je broj mirisnih brazdi najveći kod jedinki vrste *A. thelaxis*, i kreće se u rasponu od 4 do 7. Raspon je relativno najveći kod jedinki vrste *A. salicaphis* gde je broj mirisnih brazdi u rasponu od samo 1 do čak 5, pri čemu je srednja vrednost 3,26.

Tabela 8. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter TNTO/INTT, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,5098	0,4054	0,7576	0,0031	0,0556	0,0055
<i>A. salicaphis</i>	100	0,6186	0,4697	0,7759	0,0035	0,0593	0,0059
<i>A. thelaxis</i>	27	0,6045	0,5060	0,7162	0,0015	0,0384	0,0074
Ceo uzorak	228	0,5687	0,4054	0,7759	0,0059	0,0765	0,0051

Tentorijski indeks predstavlja odnos tentorijskog i intertentorijskog rastojanja. Varijabilnost ovog analiziranog karaktera u odnosu na merističke je mala, međutim, to je slučaj i sa ostalim kontinuiranim karakteristikama u poređenju sa merističkim. Najmanju varijansu pokazuje vrsta *A. thelaxis* (0,0015), dok ostale dve vrste imaju približno iste

vrednosti varijanse (0,0031 i 0,0035). Srednja vrednost za vrste *A. salicaphis* i *A. thelaxis* je približno ista (0,6186 i 0,6045) dok nešto nižu srednju vrednost ima vrsta *A. ambiguus* (0,5098) (Tabela 8).

Tabela 9. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter MLR/Od, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,2802	0,1742	0,4595	0,0029	0,0543	0,0054
<i>A. salicaphis</i>	100	0,3065	0,2168	0,4000	0,0015	0,0386	0,0039
<i>A. thelaxis</i>	27	0,3242	0,2836	0,3869	0,0005	0,0222	0,0043
Ceo uzorak	228	0,2970	0,1742	0,4595	0,0023	0,0475	0,0031

Malarni indeks predstavlja odnos malarnog rastojanja i dužine oka. Najniža varijansa je zabeležena kod jedinki vrste *A. thelaxis* (0,0005) zatim vrste *A. salicaphis* (0,0015), dok najveću varijabilnost ovog karaktera pokazuje vrsta *A. ambiguus* (varijansa = 0,0029). Shodno najvećoj varijabilnosti kod vrste *A. ambiguus* je zabeležen i najveći raspon vrednosti malarnog indeksa (od 0,1742 do 0,4595). Srednje vrednosti su relativno ujednačene za sve tri vrste i kreću se od 0,2802 kod vrste *A. ambiguus*, do 0,3242 kod jedinki vrste *A. thelaxis* (Tabela 9).

Tabela 10. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter F1š/F1d, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,3899	0,2857	0,5417	0,0019	0,0437	0,0043
<i>A. salicaphis</i>	100	0,3964	0,2879	0,4930	0,0016	0,0400	0,0040
<i>A. thelaxis</i>	27	0,4837	0,4118	0,5660	0,0019	0,0432	0,0083
Ceo uzorak	228	0,4039	0,2857	0,5660	0,0026	0,0512	0,0034

Flagelarni segmenti antena su pored merističkih karaktera analizirani i kao odnos njihove širine i dužine. Varijabilnost odnosa širine i dužine prvog flagelarnog segmenta (F1š/F1d) je prilično ujednačena za sve tri vrste ponaosob. Vrste *A. ambiguus* i *A. thelaxis* imaju iste vrednosti varijanse (0,0019), dok nešto nižu vrednost varijanse ima vrsta *A. salicaphis* (0,0016). Na osnovu srednjih vrednosti za svaku od vrsta,

očigledno je da jedinke vrste *A. thelaxis* imaju kraći prvi flagelarni segment u odnosu na ostale dve vrste. Oblik ovog karaktera je skoro identičan kod vrsta *A. ambiguus* i *A. salicaphis* (Tabela 10).

Tabela 11. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter F2š/F2d, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,4199	0,3333	0,5789	0,0020	0,0442	0,0044
<i>A. salicaphis</i>	100	0,4522	0,3500	0,5606	0,0025	0,0497	0,0050
<i>A. thelaxis</i>	27	0,5288	0,4655	0,6531	0,0019	0,0432	0,0083
Ceo uzorak	228	0,4470	0,3333	0,6531	0,0033	0,0573	0,0038

Odnos dužine i širine drugog flagelarnog segmenta (F2š/F2d) ima veoma sličnu kombinaciju statističkih parametara sa prethodnim karakterom. Vrednosti varijanse su približno iste za vrste *A. ambiguus* i *A. thelaxis* (0,0020 i 0,0019), međutim nešto veću varijabilnost ima vrsta *A. salicaphis* (0,0025), što nije bio slučaj u prethodno prikazanom karakteru. I ovde se može reći da jedinke vrsta *A. ambiguus* i *A. salicaphis* imaju izduženiji drugi flagelarni segment u odnosu na vrstu *A. thelaxis*, što se može primetiti na osnovu srednjih vrednosti za ovaj karakter. Opseg variranja je uglavnom sličan za sve tri analizirane vrste (Tabela 11).

Tabela 12. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter F5š/F5d, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,5078	0,4200	0,6800	0,0024	0,0489	0,0049
<i>A. salicaphis</i>	100	0,5001	0,4237	0,6491	0,0016	0,0398	0,0040
<i>A. thelaxis</i>	27	0,5706	0,4839	0,7000	0,0026	0,0509	0,0098
Ceo uzorak	228	0,5119	0,4200	0,7000	0,0025	0,0502	0,0033

Oblik petog flagelarnog segmenta (F5) je veoma sličan za vrste *A. ambiguus* i *A. salicaphis*, što se može videti na osnovu srednjih vrednosti ovog karaktera (0,5078 i 0,5001). Takođe, i opseg variranja je približan za dve pomenute vrste, međutim, nešto nižu vrednost varijanse imaju jedinke vrste *A. salicaphis* (0,0016). Kao i prethodna dva

flagelarna segmenta, i peti segment kod vrste *A. thelaxis* je znatno kraći u odnosu na druge dve vrste (Tabela 12).

Tabela 13. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter MSCš/GLš, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,7614	0,6584	0,8819	0,0022	0,0468	0,0047
<i>A. salicaphis</i>	100	0,7487	0,6464	0,8338	0,0019	0,0441	0,0044
<i>A. thelaxis</i>	27	0,8470	0,7626	0,9333	0,0024	0,0485	0,0093
Ceo uzorak	228	0,7659	0,6464	0,9333	0,0030	0,0548	0,0036

Vrednosti varijanse i standardne devijacije odnosa širina mezoskutuma i glave (MSCš/GLš) pokazuju prilično ujednačenu varijabilnost kada je ovaj karakter u pitanju. Srednje vrednosti kao i vrednosti minimuma i maksimuma su veoma bliske za vrste *A. ambiguus* i *A. salicaphis*, dok vrsta *A. thelaxis* ima nešto višu srednju vrednost za ovaj karakter (0,847) (Tabela 13).

Tabela 14. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter PTš/PTd, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,4745	0,4065	0,6154	0,0020	0,0444	0,0044
<i>A. salicaphis</i>	100	0,4201	0,3419	0,5034	0,0013	0,0367	0,0037
<i>A. thelaxis</i>	27	0,4366	0,3825	0,5058	0,0009	0,0300	0,0058
Ceo uzorak	228	0,4461	0,3419	0,6154	0,0022	0,0472	0,0031

Oblik petiolusa je određen odnosom njegove širine i dužine. Iako su srednje vrednosti za ovaj karakter prilično ujednačene, može se reći da najkraći petiolus ima vrsta *A. ambiguus*, dok ostale dve vrste imaju nešto izduženiji petiolus, naročito vrsta *A. salicaphis* (Tabela 14). Najnižu varijansu imaju vrste *A. salicaphis* i *A. thelaxis*, dok nešto veću vrednost ovog parametra ima vrsta *A. ambiguus* (0,002).

Tabela 15. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter KRLš/KRLd, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,3699	0,3158	0,4149	0,0006	0,0244	0,0024
<i>A. salicaphis</i>	100	0,3911	0,3191	0,4615	0,0011	0,0338	0,0034
<i>A. thelaxis</i>	27	0,4343	0,4170	0,4604	0,0001	0,0118	0,0023
Ceo uzorak	228	0,3869	0,3158	0,4615	0,0012	0,0343	0,0023

Od svih analiziranih karaktera, najniže vrednosti varijanse ima odnos širine i dužine prednjih krila (KRLš/KRLd). Naročito malu varijabilnost ima vrsta *A. thelaxis* dok ostale dve vrste pokazuju neznatno veće vrednosti varijanse. Ukoliko pogledamo srednje vrednosti za svaku vrstu ponaosob, može se primetiti tendencija širenja krila kod vrsta *A. salicaphis*, a naročito *A. thelaxis* u odnosu na jedinke vrste *A. ambiguus*. Takođe, može se primetiti da je vrednost maksimuma za vrstu *A. ambiguus* približna vrednosti minimuma za vrstu *A. thelaxis* (Tabela 15).

Tabela 16. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter STš/STd, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	0,3246	0,2419	0,3895	0,0015	0,0382	0,0038
<i>A. salicaphis</i>	100	0,3221	0,2167	0,4136	0,0018	0,0419	0,0042
<i>A. thelaxis</i>	27	0,4075	0,3654	0,4372	0,0004	0,0193	0,0037
Ceo uzorak	228	0,3333	0,2167	0,4372	0,0022	0,0469	0,0031

Kada je oblik stigme (ST) u pitanju, može se primetiti da skoro svi statistički parametri pokazuju veoma slične vrednosti za vrste *A. ambiguus* i *A. salicaphis* (Tabela 16). Najnižu vrednost varijanse za ovaj karakter ima vrsta *A. thelaxis*. Na osnovu srednjih vrednosti, stigma je znatno izduženija kod vrsta *A. ambiguus* i *A. salicaphis* u odnosu na vrstu *A. thelaxis*, pri čemu skoro da nema razlike između prethodne dve vrste.

Tabela 17. Vrednosti parametara deskriptivne statistike za karakter MCd/STd, po vrstama.

Vrsta	Broj jedinki	Srednja vrednost	Minimum	Maksimum	Varijansa	St.dev.	St. greška
<i>A. ambiguus</i>	101	1,2792	0,9435	1,6358	0,0228	0,1510	0,0150
<i>A. salicaphis</i>	100	0,8248	0,5091	1,0769	0,0177	0,1332	0,0133
<i>A. thelaxis</i>	27	1,0137	0,8533	1,1396	0,0051	0,0716	0,0138
Ceo uzorak	228	1,0485	0,5091	1,6358	0,0642	0,2535	0,0168

Poslednji analizirani karakter je odnos dužina metakarpusa i stigme (MCd/STd). Najveću varijabilnost ima upravo ovaj karakter od svih kontinuiranih karaktera koju su analizirani. Najveća varijabilnost u dužini metakarpusa je primećena kod vrste *A. ambiguus*, dok najmanja kod vrste *A. thelaxis*. Jedinke vrste *A. ambiguus* imaju najduži metakarpus, dok je kod vrste *A. salicaphis* on najkraći. Vrednosti minimuma za *A. ambiguus* su duplo veće od minimuma za vrstu *A. salicaphis*, i skoro da se poklapaju sa vrednostima maksimuma za ovu vrstu. Intermedijerne vrednosti dužine imaju jedinke vrste *A. thelaxis* (Tabela 17).

Tabela 18. Analiza varijanse morfoloških karaktera triju grupa. SS – suma kvadrata distanci, MS – suma srednjih vrednosti, obeleženi efekti su statistički značajni za $p < 0,05$.

KARAKTER	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
F1rn	173,9337	2	86,96684	63,7988	225	0,283550	306,7072	0,000000
F2rn	169,4215	2	84,71075	105,3636	225	0,468283	180,8966	0,000000
F5rn	66,6798	2	33,33992	81,8289	225	0,363684	91,6728	0,000000
TNT0/INTT	0,6345	2	0,31724	0,6951	225	0,003089	102,6851	0,000000
MSCš/GLš	0,2094	2	0,10468	0,4729	225	0,002102	49,8018	0,000000
PTš/PTd	0,1517	2	0,07586	0,3542	225	0,001574	48,1936	0,000000
STš/STd	0,1688	2	0,08439	0,3297	225	0,001465	57,5951	0,000000
MCd/STd	10,4118	2	5,20589	4,1716	225	0,018540	280,7856	0,000000
F1š/F1d	0,1976	2	0,09880	0,3972	225	0,001765	55,9723	0,000000
F2š/F2d	0,2575	2	0,12876	0,4881	225	0,002169	59,3583	0,000000
F5š/F5d	0,1086	2	0,05429	0,4633	225	0,002059	26,3669	0,000000
KRLš/KRLd	0,0916	2	0,04582	0,1760	225	0,000782	58,5571	0,000000
MLR/Od	0,0576	2	0,02879	0,4551	225	0,002023	14,2337	0,000002

Analizom varijanse utvrđeno ja da postoje statističke značajne razlike između grupa, odnosno vrsta za sve karaktere koji su korišćeni u ovoj studiji (Tabela 18).

Pored analize varijanse, urađena je i multivarijantna analiza varijanse (MANOVA). Ova statistička metoda je takođe ukazala na značajnost razlika između analiziranih grupa (Tabela 19).

Tabela 19. Multivarijantna analiza varijanse morfoloških karaktera svih grupa.

Izvor varijabilnosti	Wilks' Lambda	F	Effect df	Error df	p
Vrsta	0,029202	79,50	26	426	0,00

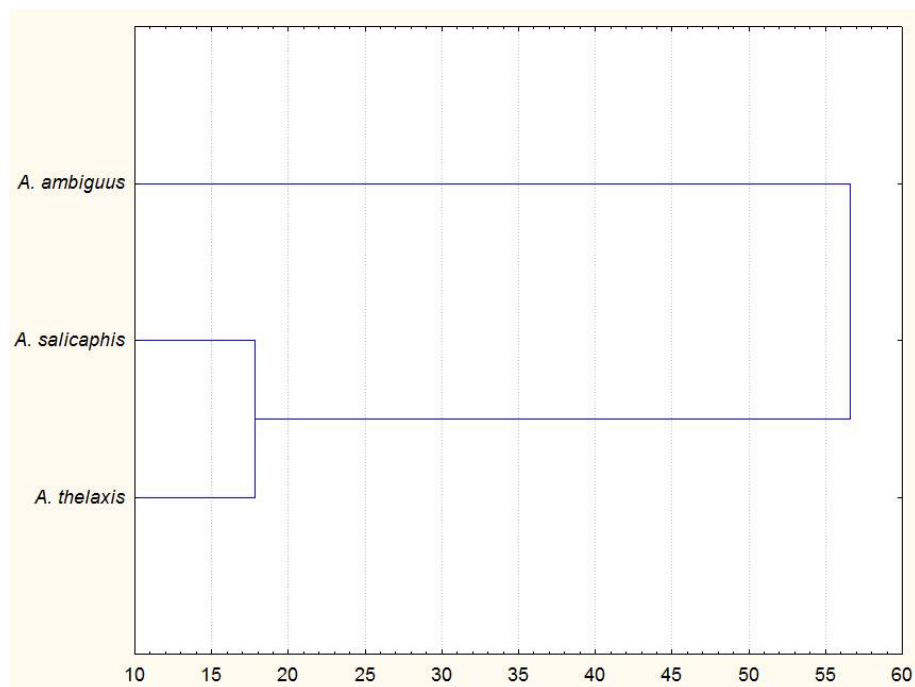
Da bi se utvrdilo koji karakteri najviše utiču na razdvajanje unapred formiranih grupa korišćena je diskriminantna kanonijska analiza. Ova metoda ističe međugrupno variranje karaktera u odnosu na unutargrupno.

Tabela 20. Vrednosti diskriminantne kanonijske analize.

Vrsta	<i>A. ambiguus</i>	<i>A. salicaphis</i>	<i>A. thelaxis</i>
Kvadratne Mahalanobis-ove distance			
<i>A. ambiguus</i>	0,00000		
<i>A. salicaphis</i>	46,58919	0,00000	
<i>A. thelaxis</i>	66,65330	17,82495	0,00000
F-vrednosti; df = 13,213			
<i>A. ambiguus</i>	0,00000		
<i>A. salicaphis</i>	170,4764	0,00000	
<i>A. thelaxis</i>	103,4071	27,59574	0,00000
p			
<i>A. ambiguus</i>	0,00		
<i>A. salicaphis</i>	0,00	0,00	
<i>A. thelaxis</i>	0,00	0,00	0,00

Diskriminantna analiza je obuhvatila sve analizirane karaktere sem broja segmenata maksilarnih i labijalnih palpusa (MP i LP) kod kojih nije bilo variranja. Grupa, odnosno vrsta, je korišćena kao faktor grupisanja jedinki. Ovom analizom su izračunate distance između grupa, koje su predstavljene kvadratnim Mahalanobis-ovim distancama (Tabela 20), kao i procenat tačnosti grupisanja jedinki u svaku od tri unapred definisane grupe (Tabela 21).

Primenom UPGMA metode na kvadratne Mahalanobis-ove distance konstruisan je dendrogram na kome se jasno izdvajaju tri analizirane grupe, odnosno vrste, pri čemu su na osnovu analiziranih morfoloških karaktera jedinke vrste *A. salicaphis* i *A. thelaxis* bliže pozicionirane u odnosu na jedinke vrste *A. ambiguus*, koja se posebno izdvaja (Slika 6).



Slika 6. UPGMA dendrogram konstruisan iz matrice razlika kvadratnih Mahalanobis-ovih distanci.

Tabela 21. Matrica korektne klasifikacije u unapred definisane grupe. Redovi predstavljaju uočenu pripadnost, a kolone unapred predviđenu pripadnost. „Total“ predstavlja ukupan procenat korektne klasifikacije.

Vrsta	% tačnog grupisanja	<i>A. ambiguus</i>	<i>A. salicaphis</i>	<i>A. thelaxis</i>
<i>A. ambiguus</i>	100,0000	101	0	0
<i>A. salicaphis</i>	100,0000	0	100	0
<i>A. thelaxis</i>	96,2963	0	1	26
Total	99,5614	101	101	26

Procenat tačnosti grupisanja jedinki u prethodno određene grupe je dat u Tabeli 21. Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da je tačnost grupisanja izuzetno visoka. Samo je jedna jedinka vrste *A. thelaxis* „pogrešno“ grupisana sa jedinkama vrste *A. salicaphis*.

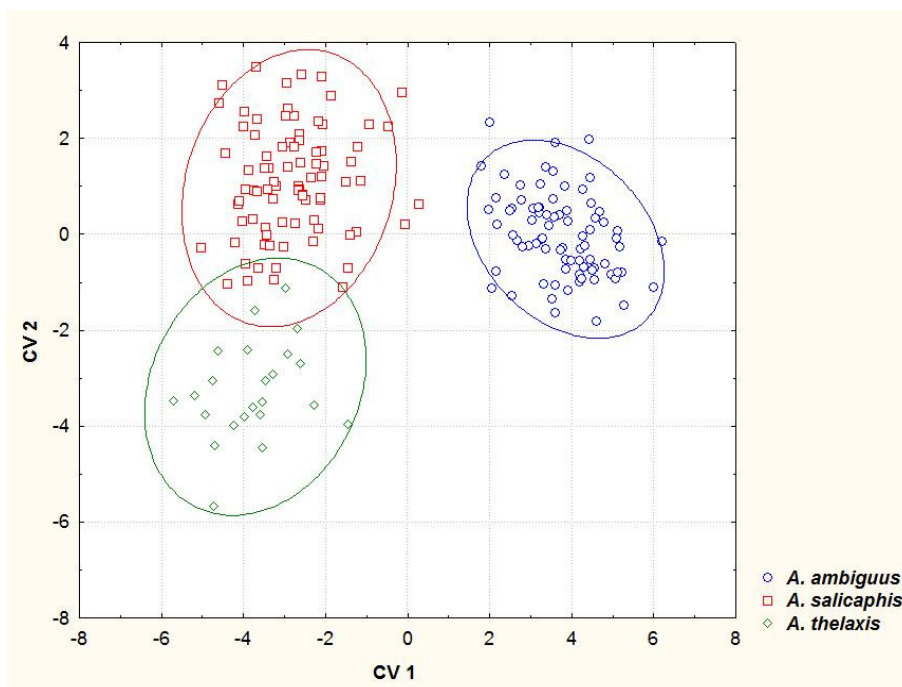
Tabela 22. Standardizovani koeficijenti kanonijskih varijabli.

Karakter	CV1	CV2
F1rn	-0.54810	-0.056488
F2rn	-0.09476	-0.345951
F5rn	0.05219	-0.166860
TNT0/INTT	-0.39462	0.318295
MSCš/GLš	0.20897	-0.407671
PTš/PTd	0.37070	-0.242192
STš/STd	-0.53313	-0.459082
MCd/STd	1.13953	-0.145627
F1š/F1d	-0.04607	-0.103003
F2š/F2d	-0.26541	-0.043008
F5š/F5d	0.05837	-0.339565
KRLš/KRLd	-0.08529	0.203754
MLR/Od	0.17165	0.077554
Eigenval	12.02465	1.629184
Cum.Prop	0.88068	1.000000

Ukupna varijabilnost analiziranog uzorka po svim karakteristikama je objašnjena sa dve kanonijske ose koje imaju visoku statističku značajnost. χ^2 testom utvrđeno je da prva kanonijska osa (CV1) nosi najviše razlika između grupa, 88,068 % dok druga kanonijska osa (CV2) objašnjava 11,932 % razlika (Tabela 22).

Kao što je već pomenuto, CVA analiza jasno ukazuje na postojanje statistički značajnih razlika u morfologiji između analiziranih grupa. U Tabeli 22. su obeleženi karakteri koji najviše doprinose razdvajanju grupa po prikazanim CV osama. Značajnost pojedinačnih karaktera je ograničena na minimum 0,3. Po prvoj CV osi razdvajanju najviše doprinosi karakter MCd/STd koji definiše odnos dužine metakarpusa i stigme. Već je pomenuto da dužina metakarpusa znatno varira između analiziranih vrsta. Drugi karakter koji značajno doprinosi razdvajanju je STš/STd, što predstavlja odnos širine i dužine stigme. Na isti način doprinosi i broj mirisnih brazdi na prvom flagelarnom članku antena (F1rn). Nešto manji doprinos ima tentorijalni indeks (TNTO/INTT). Druga CV osa objašnjava znatno manji procenat razlika, međutim po ovoj osi razdvajanju najviše doprinose karakteri STš/STd i TNTO/INTT, što se poklapa sa prvom kanonijskom osom. Pored ova dva karaktera, i odnos širine mezoskutuma i glave (MSCš/GLš) značajno doprinosi razdvajanju, kao i odnos širine i dužine krila i broj mirisnih brazdi na drugom flagelarnom članku antena.

Na osnovu dve kanonijske ose je konstruisan grafički prikaz razdvajanja vrsta roda *Adialytus* (Slika 7).



Slika 7. Distribucija jedinki roda *Adialytus* duž prve (CV1) i druge (CV2) kanonijske ose.

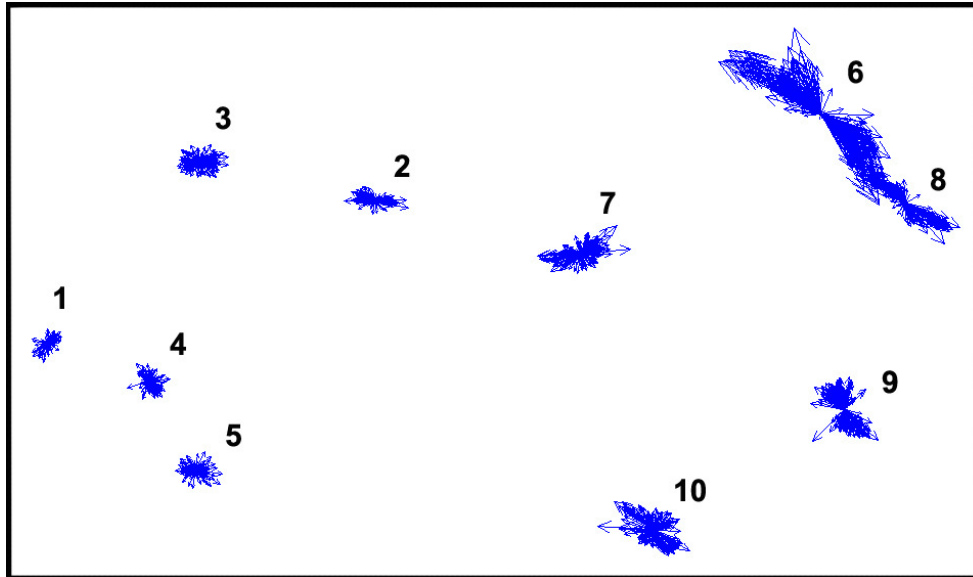
Elipse obuhvataju interval od 0,95.

Na grafiku se jasno vidi razdvajanje jedinki po vrstama, s tim što dolazi do delimičnog preklapanja između vrsta *A. salicaphis* i *A. thelaxis* koje se nalaze u negativnom delu CV1 ose. Vrsta *A. ambiguus* se jasno izdvaja od pomenute dve vrste i nalazi se u pozitivnom delu CV1 ose, dok druga CV osa razdvaja vrste *A. salicaphis* i *A. thelaxis* pri čemu prva vrsta zauzima pozitivni deo ose, a druga negativni deo (Slika 7).

4.2. Geometrijska morfometrija

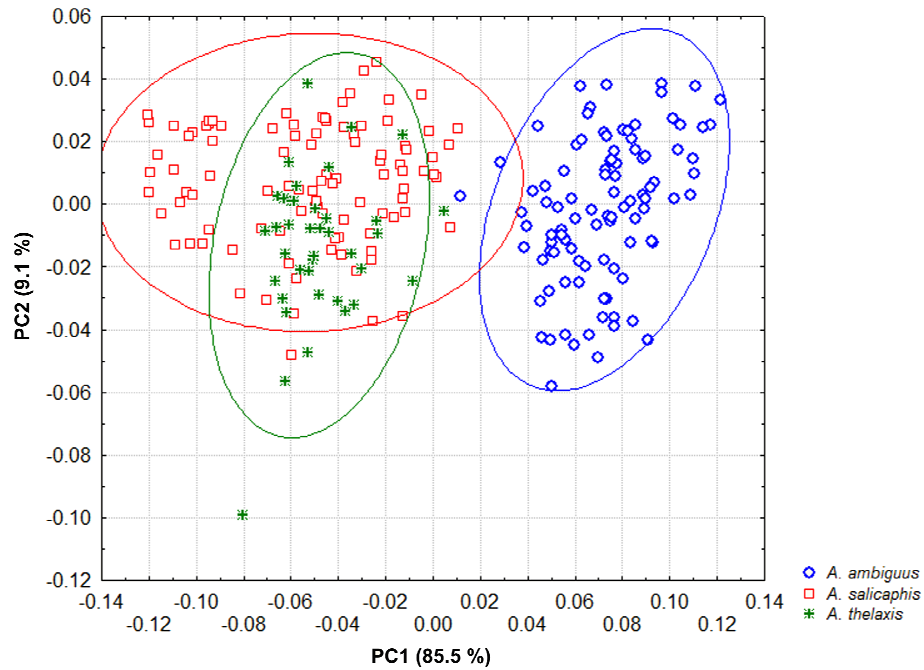
Za analizu oblika krila korišćena je metoda geometrijske morfometrije. Varijabilnost u obliku krila je ispitana koristeći samo prednja desna krila ženki koja su opisana sa ukupno deset homologih tačaka (Slika 3). Ukupno je analizirano 237 jedinki roda *Adialytus*. Skoro podjednak broj krila pripada vrstama *A. ambiguus* i *A. salicaphis*, prva obuhvata 98 krila, dok drugoj vrsti pripada 99. Vrsta *A. thelaxis* obuhvata 40 jedinki.

Pomoću programa TpsRelw je proverena tačnost postavljanja tačaka i pri tome je utvrđena konsenzus konstelacija tačaka na svim analiziranim krilima. Na Slici 8 je pokazano da su sve tačke postavljene precizno, a vektori tačaka određuju njihovu disperziju. Vektori u tački 6 su znatno dispergovani, za razliku od ostalih tačaka, što se objašnjava različitom dužinom metakarpusa (nerv R1) između tri analizirane vrste.



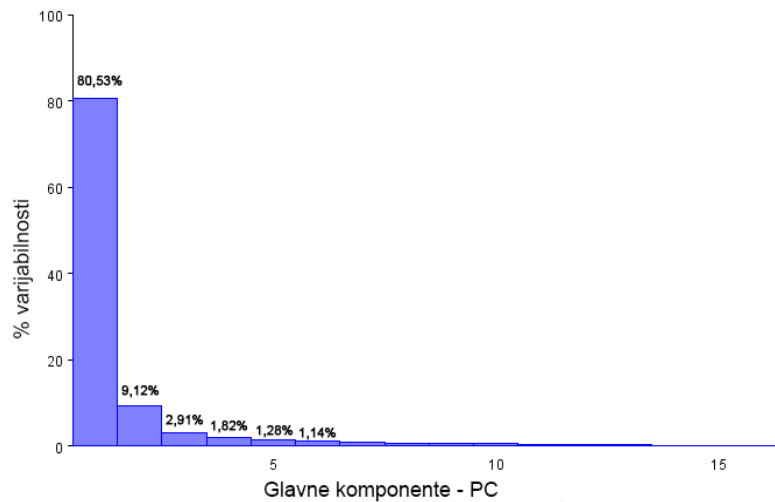
Slika 8. Konsenzus konstelacija svih tačaka na svim analiziranim krilima.

Da bi se ispitala varijabilnost u morfologiji krila, pristupilo se analizi glavnih komponenti – PCA. Rezultati PCA analize su pokazali da postoji polarizacija analiziranih jedinki, odnosno razdvajanje po prvoj i drugoj PC osi po vrstama. Raspored jedinki u morfoprostoru koji definišu PC1 i PC2 osa je prikazan na Slici 9. Može se primetiti izvesno preklapanje jedinki vrsta *A. salicaphis* i *A. thelaxis* koje se nalaze u negativnom delu prve PC ose. Međutim, jedinke vrste *A. ambiguus* su pozicionirane na suprotnom kraju PC1 ose i potpuno su izolovane od ostale dve vrste. Ovo slabo razdvajanje je verovatno posledica dužine R1 nerva, odnosno metakarpusa, koji kod obe vrste ima približno istu dužinu, to jest znatno kraću od populacija vrste *A. ambiguus*.



Slika 9. Analiza glavnih komponenti (PCA) varijabilnosti oblika prednjih krila. Elipse obuhvataju interval od 0,95.

Varijabilnost koju nose PC ose je prikazana na Slici 10 gde je očigledno da najveći procenat varijabilnosti nosi prva PC osa (83,23%) dok druga PC osa nosi znatno manji procenat varijabilnosti (9,1%). Sve ostale PC ose nose sukcesivno sve manji procenat varijabilnosti.

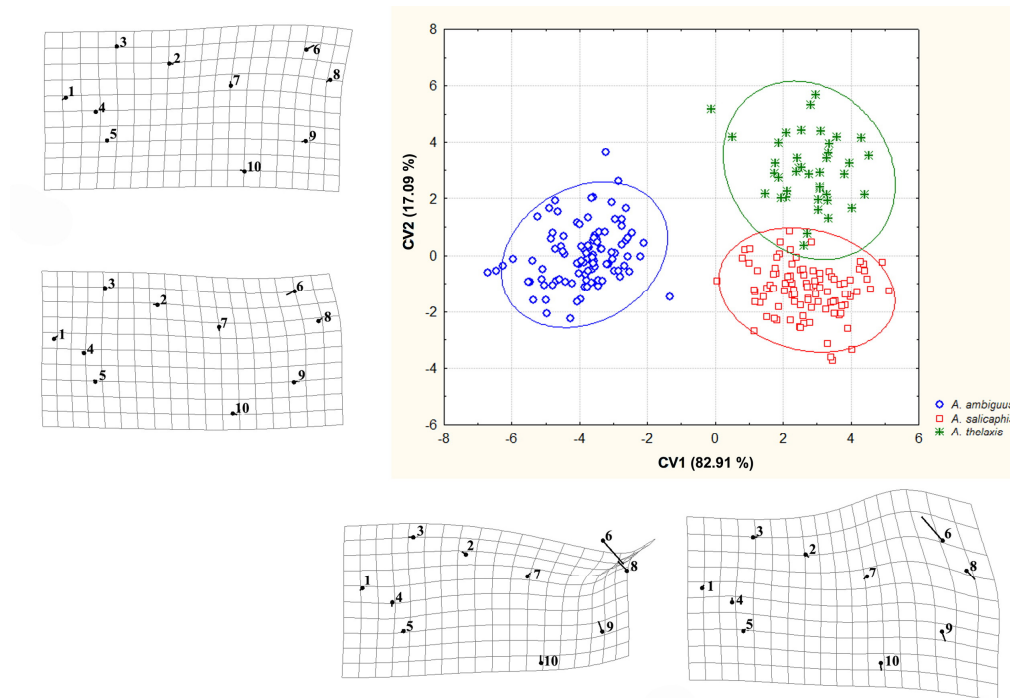


Slika 10. Procenat varijabilnosti glavnih komponenti. Vrednosti su prikazane za prvih šest osa; Ostale PC ose nose varijabilnost manje od 1%.

Da bi se utvrdilo da li postoji statistički značajna razlika u veličini krila između analiziranih vrsta, urađena je analiza varijanse, pri čemu se kao promenljiva koristi veličina centroida (CS). ANOVA: $F_{(2, 234)} = 5,99$; $P = 0,002899$.

Pored analize varijanse, urađena je i multivarijantna analiza varijanse dobijenih PC skorova kao zavisnim promenljivim, koja je takođe pokazala statistički značajne razlike u obliku krila analiziranih grupa jedinki. MANOVA: Wilks' $\lambda = 0,026928$; $F(32, 438) = 69,72$; $P < 0,000001$.

S obzirom na to da je varijabilnost u veličini i obliku krila statistički značajna, uzorak je podvrgnut i kanonijskoj analizi (CVA) koja nam znatno jasnije prikazuje razdvajanje analiziranih grupa. Na osnovu CVA analize ukupna varijabilnost je opisana sa dve CV ose pri čemu prva opisuje 82,91% ukupnih razlika, dok druga opisuje preostalih 17,09% razlika. Na Slici 11 je prikazan morfološki prostor definisan prvom i drugom CV osom u kom su raspoređene jedinke analiziranih vrsta roda *Adialytus*.



Slika 11. Distribucija jedinki duž prve i druge kanonijske ose. Mreže deformacije ilustruju promene oblika krila u odnosu na prvu i drugu CV osu. Elipse obuhvataju interval od 0,95.

Kao i pri PCA analizi, i kanonijska analiza je pokazala razdvajanje analiziranih jedinki po vrstama, s tim što je u ovom slučaju znatno jasnije prikazano. Na grafiku koji određuju prva i druga CV osa jedinke vrsta *A. salicaphis* i *A. thelaxis* se nalaze u pozitivnom delu CV1 ose koja ih razdvaja od jedinki *A. ambiguus*. Na mrežama deformacije se može primetiti da do razdvajanja po prvoj osi pre svega dolazi zbog pomeranja tački 6 i 8. Jedinke *A. salicaphis* i *A. thelaxis* imaju znatno kraći R1 nerv, odnosno metakarpus u odnosu na jedinke *A. ambiguus* kod kojih je pored kratkog metakarpusa primetna i tendencija sužavanja krilne ploče (tačke 9 i 10). Druga kanonijska osa, iako nosi znatno manji procenat razlika, razdvaja jedinke vrste *A. thelaxis* od ostale dve vrste, naročito od vrste *A. salicaphis* sa kojom deli sličnu dužinu metakarpusa. Na osnovu deformacije mreža, primetno je da su prednja krila *A. thelaxis* neznatno šira u proksimalnom delu u odnosu na vrstu *A. salicaphis* (tačke 1 i 2), a takođe i u gornjoj regiji distalnog dela krilne ploče. Međutim, najuočljivija karakteristika koja razdvaja *A. thelaxis* od *A. salicaphis* je sam oblik R1 nerva. Krila jedinki *A. salicaphis* imaju više zaobljen metakarpus (R1 nerv), za razliku od *A.*

thelaxis, što samim tim i određuje oblik ovog dela krilne ploče (tačka 6). Tačke 3-5, koje opisuju proksimalni deo krila su uglavnom nepromenjenih pozicija, što ukazuje na konzerativnost ovog dela krilne ploče. Takođe, i tačka 7 koja se nalazi na kraju nerva RS, odnosno radijalnog sektora zadržava uglavnom stalnu poziciju na deformacionim pločama, pri tom ukazujući na nepromenjenost ovog dela krila kod sve tri vrste.

Ukoliko pogledamo procenat korektne klasifikacije u unapred definisane grupe, odnosno vrste, koja je diskriminisana na osnovu CV distanci, može se primetiti veoma visok procenat tačnosti (Tabela 23). Vrste *A. ambiguus* i *A. salicaphis* su grupisane sa stoprocentnom tačnošću, dok su samo dve jedinke vrste *A. thelaxis* klasifikovane u grupu sa *A. salicaphis*.

Tabela 23. Matrica korektne klasifikacije u unapred definisane grupe na osnovu CV distanci. Redovi predstavljaju uočenu pripadnost, a kolone unapred predviđenu pripadnost. „Total“ predstavlja ukupan procenat korektne klasifikacije.

Vrsta	% tačnog grupisanja	<i>A. ambiguus</i>	<i>A. salicaphis</i>	<i>A. thelaxis</i>
<i>A. ambiguus</i>	100,0000	98	0	0
<i>A. salicaphis</i>	100,0000	0	99	0
<i>A. thelaxis</i>	95,0000	0	2	38
Total	99,1561	98	101	38

4.3. Molekularne analize

Molekularne analize su obuhvatile dva seta jedinki. Iz prvog seta jedinki, koji uključuje tri istraživane vrste roda *Adialytus*, je izolovan deo mitohondrijalnog gena za COI. Drugi set jedinki, pored vrsta roda *Adialytus*, obuhvata i jedinke rodova *Lysiphlebia* i *Lysiphlebus* iz kojih je izolovan deo ribozomalnog gena 28S rRNK.

Deo mtCOI gena je izolovan i umnožen kod 65 jedinki roda *Adialytus*. Po 29 jedinki pripada vrstama *A. ambiguus* i *A. salicaphis*, dok sedam jedinki pripada vrsti *A. thelaxis*. Vrsta *A. ambiguus* uključuje u ovu analizu i jedinke dva fenotipa koje su detaljno opisali Rakhshani et al., (2012). Amplifikovan je mtCOI gen iz tri jedinke „*A. arvicola*“ fenotipa i takođe tri jedinke „*A. cf. ambiguus*“ fenotipa. Kao „autgrupe“ su korišćene sekvence vrsta: *Lysiphlebia japonica*, *Lysiphlebus fabarum*, *Areopraon lepellei* (Waterston 1926) i *Cotesia* sp. (Microgastrinae, Braconidae).

Dužina sekvenciranih produkata je bila oko 670 baznih parova (bp). Nakon pregleda i poravnanja sve sekvence su dovedene na istu dužinu od 619 bp. Ova dužina sekvenci je korišćena za filogenetske analize.

Što se tiče ribozomalnog gena za 28S rRNK, koji je korišćen za analizu filogenetskih odnosa u okviru podtribusa Lysiphlebina, DNK je sekvencirana kod ukupno 26 jedinki. Tri vrste roda *Adialytus* su analizirane korišćenjem 15 sekvenci (*A. ambiguus* – 5, *A. salicaphis* – 7 i *A. thelaxis* – 3), 10 sekvenci pripada rodu *Lysiphlebus* (*L. cardui* – 2, *L. confusus* – 3, *L. fabarum* – 3, *L. fritzmulleri* – 1 i *L. testaceipes* – 1), dok jedna sekvenca pripada rodu *Lysiphlebia* tj. vrsti *L. japonica*. U ovom slučaju su kao autgrupni taksoni korišćene sekvence vrsta *Euaphidius setiger* i *Ephedrus californicus* koja je preuzeta iz banke gena (Acc. No.: AJ302938).

Umnoženi produkti su prvobitno imali dužinu od oko 770 baznih parova, međutim nakon poravnanja, sve sekvence su dovedene na dužinu od 687 bp, uključujući i sve indele (insercije i delecije).

4.3.1. Analiza sekvenci mtCOI gena i filogenetska rekonstrukcija

Nakon analize sekvenci, utvrđeno je da u grupi *A. ambiguus* postoji ukupno devet haplotipova. Svaki od haplotipova nosi oznaku za vrstu i redni broj (A1-A9) i obuhvata od 1 do 10 jedinki po haplotipu. Ukupno osam haplotipova je registrovano u grupi *A. salicaphis* (S1-S8), sa 1 do 8 jedinki po haplotipu. *Adialytus thelaxis* obuhvata samo dva haplotipa (T1-T2) prvi sa jednom jedinkom, dok drugi obuhvata šest jedinki. S obzirom na to da između jedinki unutar istog haplotipa nema genetičkih razlika, u daljem radu je korišćena po jedna jedinka iz svakog haplotipa, pre svega zbog lakšeg sagledavanja tako dobijenih rezultata.

Analizom strukture utvrđeno je da sve sekvence za COI gen u okviru roda *Adialytus* imaju relativno nizak sadržaj G-C parova, u proseku 25,9% (24,9-27,2%). Kod analiziranih sekvenci postoji ukupno 46 varijabilnih mesta, od tog broja 44 mesta su informativna za parsimoniju, dok ostala dva predstavljaju takozvane „singleton“ mutacije (Tabela 24). U okviru grupe *A. ambiguus* može se primetiti da se najveći broj promena, odnosno supstitucija, nalazi kod jedinki haplotipa A3 na pozicijama 267, 324 i 519. Pozicija 267 je interesantna po tome što haplotipovi A2 i A3 dele istu promenu sa haplotipovima S6, S7 i S8, za razliku od svih ostalih haplotipova (uključujući T1 i T2). Slična situacija je i na poziciji 324, s tim što u ovom slučaju haplotipovi A2 i A3 imaju na tom mestu guanin, haplotipovi S6, S7 i S8 imaju timin, dok svi ostali na tom mestu poseduju adenin. U okviru grupe *A. salicaphis* najveći broj promena u odnosu na ostale haplotipove iz ove grupe ima haplotip S7 koji poseduje čak sedam promena na pozicijama 267, 288, 291, 324, 375, 453 i 585.

Tabela 24. Šema nukleotidnih supstytucija informativnih za parsimoniju.

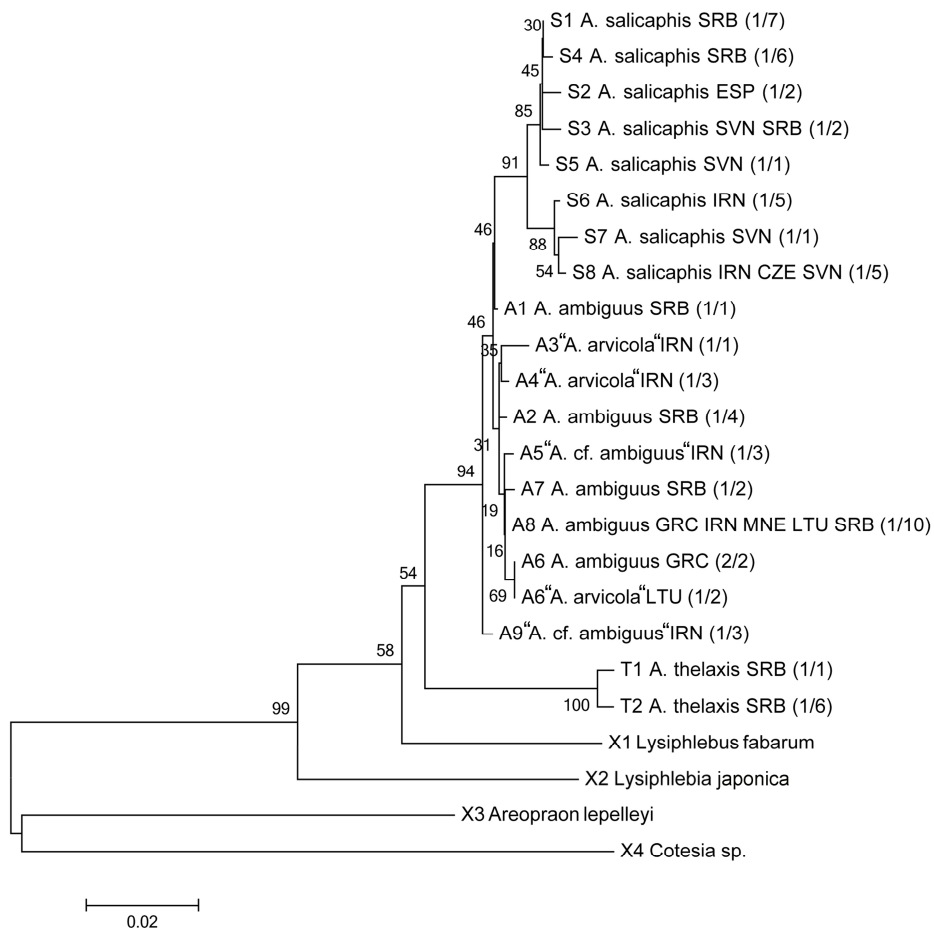
	3 6	3 9	5 4	7 2	1 1	1 7	1 3	1 4	1 5	1 6	1 7	1 9	1 9	2 1	2 2	2 3	2 4	2 4	2 5	2 6	2 6	2 7	2 8	2 8	2 9	3 0	3 2	3 2	3 3	3 3	3 4	3 7	4 2	4 2	4 5	4 5	4 6	4 6	4 8	4 8	4 9	4 9	5 0	5 1	5 3	5 3	5 5	5 5	5 8	5 8	5 9	5 9
A 1	A	T	A	A	G	G	T	A	A	A	T	A	A	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	A	A	T	C	T	T	A	A	T	T	A	T	A	A	A	G	A	T	T										
A 2	A	T	A	A	G	G	T	A	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	A	A	A	T	C	T	T	A	A	T	T	A	T	A	A	A	G	A	T	T										
A 3	A	T	A	A	G	G	T	A	G	A	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	A	T	T	T	A	A	G	T	C	T	T	A	A	T	T	A	T	A	A	T	A	A	T	T								
A 4	A	T	A	A	G	G	T	A	G	A	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	A	G	T	C	T	T	A	A	T	T	A	T	A	A	A	G	A	T	T								
A 5	A	T	A	A	G	G	T	A	G	A	C	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	A	A	T	C	T	T	A	A	T	T	A	T	A	A	A	G	A	T	T								
A 6	A	T	A	A	G	G	T	A	G	A	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	A	A	T	C	T	T	A	A	T	T	A	C	A	A	A	G	A	T	T								
A 7	A	T	A	A	G	G	T	A	G	A	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	A	A	T	T	T	A	A	T	T	A	T	A	A	A	G	A	T	T									
A 8	A	T	A	A	G	G	T	A	G	A	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	A	A	T	C	T	T	A	A	T	T	A	T	A	A	A	G	A	T	T								
A 9	A	T	A	A	A	A	T	A	G	A	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	A	A	T	C	T	T	A	A	T	T	A	T	A	A	A	G	A	T	T								
S 1	A	T	A	A	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	G	A	T	C	C	T	A	A	T	T	G	T	A	A	A	G	G	T	T								
S 2	A	T	A	A	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	A	T	G	T	T	G	T	T	T	A	G	A	T	C	C	T	A	A	T	T	G	T	A	A	A	G	G	T	T									
S 3	A	T	A	A	G	G	T	A	A	G	A	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	G	A	T	C	C	T	A	A	C	T	G	T	A	A	A	G	G	T	C								
S 4	A	T	A	A	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	G	A	T	C	C	T	A	A	T	T	G	T	A	A	A	G	G	T	C								
S 5	A	T	A	A	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	G	T	T	T	A	G	A	T	C	C	T	A	A	T	T	G	T	A	A	A	A	G	T	T								
S 6	A	T	A	A	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	A	T	A	T	A	G	T	T	C	T	T	A	G	T	T	G	T	A	A	A	G	G	T	T								
S 7	A	T	A	A	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	A	T	A	C	A	G	T	T	C	T	T	A	G	T	T	G	T	A	A	A	G	A	T	T								
S 8	A	T	A	A	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	T	A	T	A	T	T	A	T	A	C	A	G	T	T	C	C	T	A	G	T	T	G	T	A	A	A	G	G	T	T								
T 1	T	A	G	T	A	A	T	G	A	A	C	T	G	G	T	G	C	A	A	C	G	A	T	T	G	A	A	G	C	T	A	G	A	T	A	A	T	G	G	T	T	A	C	T								
T 2	T	A	G	T	A	A	C	G	A	A	A	T	G	G	T	G	C	A	A	C	G	A	T	T	G	A	A	G	C	T	A	G	A	T	A	A	T	G	G	T	T	A	C	T								

Takođe, može se primetiti da haplotipovi S6-S8 dele šest zajedničkih promena u odnosu na ostale haplotipove *A. salicaphis* grupe, što ukazuje na postojanje dveju različitih linija u okviru ove analizirane grupe (Tabela 24).

Što se tiče grupe *A. thelaxis*, dva haplotipa se međusobno razlikuju samo na pozicijama 138 i 171. Međutim, u odnosu na dve ostale grupe poseduju promene na čak 25 mesta.

Rekonstrukcija filogenetskih odnosa u okviru roda *Adialytus* izvedena primenom „Maximum likelihood“ metode (ML), uz primenu modela Hasegawa-Kishino-Yano sa gama distribucijom (Gamma Distributed) i metode Maksimalne parsimonije (MP). Kao autgrupe su korišćene jedinke *Lysiphlebia japonica*, *Lysiphlebus fabarum*, *Areopraon lepelleyi* i *Cotesia* sp.

Filogenetsko stablo konstruisano primenom ML metode je prikazano na Slici 12. Sa stabla se može videti da je klada koju čine jedinke *A. thelaxis* jasno izdvojena od manje-više zajedničke klade koju čine jedinke *A. ambiguus* i *A. salicaphis*. Relacije između *A. ambiguus* i *A. salicaphis* su pomalo nejasne, s obzirom na to da divergencija ove dve grupe nema veliku podršku na stablu. U okviru grupe *A. ambiguus* haplotipovi A1 i A9 su potpuno izdvojeni od glavne klade koju čine ostali haplotipovi (A2-A8). Haplotip A9, koji predstavlja *A. cf. ambiguus*, se pozicionira na stablu kao bazalni takson za zajedničku kladu koju grade *A. ambiguus* i *A. salicaphis*. Takođe, klada koju predstavljaju svi *A. salicaphis* haplotipovi poseduje sestrinski takson predstavljen haplotipom A1, koji je u stvari *A. ambiguus*. Klada koju predstavljaju *A. salicaphis* haplotipovi je veoma koherentna, sa veoma visokom podrškom izdvajanja. Međutim, kao što je već pomenuto, može se primetiti divergencija na dve linije haplotipova. Jednu liniju predstavljaju haplotipovi S1-S5, dok drugu čine tri haplotipa S6, S7 i S8.

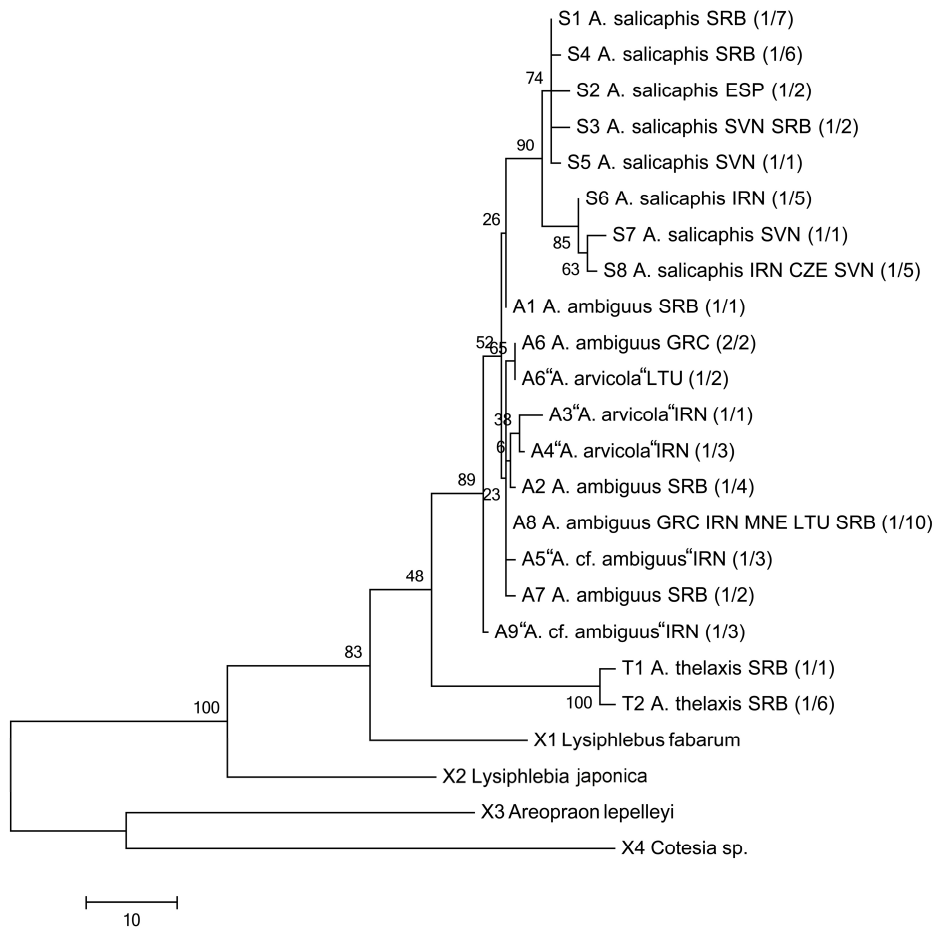


Slika 12. Filogenetsko stablo dobijeno korišćenjem „Maximum likelihood“ metode. „Bootstrap“ metoda sa 1000 ponavljanja je primenjena za testiranje podrške svake od grana. Brojevi iznad grana predstavljaju „bootstrap“ podršku. Pored svakog taksona je prikazano poreklo uzorka i broj jedinki u okviru datog haplotipa.

Sve jedinke vrste *A. ambiguus* koje su označene kao fenotip „*A. arvicola*“ se klastriraju zajedno sa ostalim *A. ambiguus* haplotipovima i ne pokazuju neko posebno grupisanje. Situacija je veoma slična i kada je u pitanju drugi fenotip, označen kao *A. cf. ambiguus*.

Rekonstrukcijom filogenetskih odnosa metodom Maksimalne parsimonije dobijeno je 55 mogućih stabala, od čega je na Slici 13 prikazano jedno. Rekonstrukcija filogenetskih odnosa MP metodom pokazuje identičan rezultat kao i rekonstrukcija ML metodom. Dobijena filogenetska stabla imaju skoro identičnu topologiju i veoma slične

vrednosti „bootstrap“ podrške. Jedina razlika na prikazanom stablu je u orijentaciji taksona u okviru *A. ambiguus* klade.



Slika 13. Jedno od 55 mogućih filogenetskih stabala konstruisanih MP metodom. („Close-Neighbor-Interchange“ algoritam). „Bootstrap“ podrška je prikazana u nivou grananja. Za mesta informativna za parsimoniju indeks konzistencije je 0,691358. Pored svakog taksona je prikazano poreklo uzorka i broj jedinki u okviru datog haplotipa.

Razlika između haplotipova analiziranih jedinki kvantifikovana je Kimurinim dvoparametarskim (K2P) distancama (Tabela 25). Na osnovu genetičkih distanci utvrđeno je da se *A. thelaxis* razlikuje od *A. ambiguus* za 4,9%, dok se od *A. salicaphis* razlikuje za 6%. Prosečna genetička distanca između *A. ambiguus* i *A. salicaphis* iznosi 1,4%, međutim opseg vrednosti distance između ove dve vrste je od 0,8 do 2,2% (Tabela 25).

Tabela 25. Matrica K2P distanci nakon „pairwise“ poređenja sekvenci dela mtCOI gena za tri vrste roda *Adialytus*.

HAPLOTIP	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	T1	T2
A1 (<i>A. ambiguus</i>)																			
A2 (<i>A. ambiguus</i>)	0.003																		
A3 (<i>A. ambiguus</i>)	0.008	0.005																	
A4 (<i>A. ambiguus</i>)	0.003	0.003	0.005																
A5 (<i>A. ambiguus</i>)	0.003	0.003	0.008	0.003															
A6 (<i>A. ambiguus</i>)	0.003	0.003	0.008	0.003	0.003														
A7 (<i>A. ambiguus</i>)	0.003	0.003	0.008	0.003	0.003	0.003													
A8 (<i>A. ambiguus</i>)	0.002	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002												
A9 (<i>A. ambiguus</i>)	0.005	0.005	0.010	0.005	0.005	0.005	0.005	0.003											
S1 (<i>A. salicaphis</i>)	0.008	0.011	0.016	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.013										
S2 (<i>A. salicaphis</i>)	0.011	0.015	0.020	0.015	0.015	0.015	0.015	0.013	0.016	0.003									
S3 (<i>A. salicaphis</i>)	0.013	0.016	0.021	0.016	0.015	0.016	0.016	0.015	0.018	0.005	0.008								
S4 (<i>A. salicaphis</i>)	0.010	0.013	0.018	0.013	0.013	0.013	0.013	0.011	0.015	0.002	0.005	0.003							
S5 (<i>A. salicaphis</i>)	0.010	0.013	0.015	0.013	0.013	0.013	0.013	0.011	0.015	0.002	0.005	0.006	0.003						
S6 (<i>A. salicaphis</i>)	0.013	0.013	0.016	0.015	0.016	0.016	0.016	0.015	0.018	0.008	0.011	0.013	0.010	0.010					
S7 (<i>A. salicaphis</i>)	0.015	0.015	0.018	0.016	0.018	0.018	0.018	0.016	0.020	0.013	0.016	0.018	0.015	0.015	0.005				
S8 (<i>A. salicaphis</i>)	0.016	0.016	0.020	0.018	0.020	0.020	0.020	0.018	0.021	0.008	0.011	0.013	0.010	0.010	0.003	0.005			
T1 (<i>A. thelaxis</i>)	0.045	0.049	0.049	0.049	0.045	0.049	0.049	0.047	0.043	0.054	0.057	0.057	0.056	0.054	0.059	0.061	0.063		
T2 (<i>A. thelaxis</i>)	0.045	0.048	0.049	0.048	0.047	0.048	0.048	0.047	0.043	0.054	0.057	0.056	0.056	0.054	0.059	0.061	0.063	0.005	

Genetičke distance između jedinki fenotipa „*A. arvicola*“ i ostalih jedinki vrste *A. ambiguus* variraju u rasponu od 0 do 1% (prosečno 0,3%). Slično je i sa fenotipom *A. cf. ambiguus*, prosečna genetička distanca u odnosu na ostale *A. ambiguus* haplotipove iznosi 0,4% (0,2-1%). Međutim, i pored ovako male distance haplotip A9, koji predstavlja fenotip *A. cf. ambiguus*, nije uključen u glavnu *A. ambiguus* kladu. Prosečna vrednost genetičke distance A9 haplotipa u odnosu na *A. salicaphis* haplotipove iznosi 1,6% (raspon 1,2-2,2%).

Kada je u pitanju haplotip A1, koji se na prikazanim filogenetskim stablima pozicionira kao sestrinski takson kladi *A. salicaphis*, distanca u odnosu na sve *A. salicaphis* haplotipove iznosi prosečno 1,2% (0,8-1,7%). Međutim, u odnosu na *A. ambiguus* haplotipove, A1 se razlikuje u proseku za 0,3% (raspon 0,2-0,8%).

Distance unutar svake od grupa su relativno male i iznose 0,3% unutar *A. ambiguus*, 0,6% unutar *A. salicaphis* i 0,1% unutar *A. thelaxis* grupe (Tabela 26).

Tabela 26. Matrica K2P distanci unutar (zatomnjeno) i između vrsta roda *Adialytus*.

	<i>A. ambiguus</i>	<i>A. salicaphis</i>	<i>A. thelaxis</i>
<i>A. ambiguus</i>	0,003		
<i>A. salicaphis</i>	0,014	0,006	
<i>A. thelaxis</i>	0,049	0,06	0,001

4.3.2. Analiza sekvenci gena za 28S rRNK i filogenetska rekonstrukcija

Analiza dela ribozomalnog gena za 28S rRNK obuhvatila je tri roda podtribusa Lysiphlebina: *Adialytus*, *Lysiphlebus* i *Lysiphlebia*. Iz roda *Adialytus* analizirane su tri vrste, koje su korišćene i u prethodnim analizama, rod *Lysiphlebus* je u ovoj analizi predstavljen sa pet vrsta, dok je rod *Lysiphlebia japonica* jedini predstavnik roda *Lysiphlebia* (Tabela 3).

Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je postojanje ukupno sedam haplotipova. Po tri haplotipa pripada rodovima *Adialytus* (SA1-SA3) i *Lysiphlebus* (L1-L3), dok jedan pripada rodu *Lysiphlebia* (Lj).

Analiza strukture sekvenci je pokazala da sve sekvence imaju veoma ujednačen sastav nukleotida. Sadržaj G-C parova je niži u odnosu na A-T parove i iznosi 31,9 % (G-C), odnosno 68,1 % (A-T). Kod svih sekvenci postoji ukupno 46 varijabilnih mesta, od toga 27 je informativno za parsimoniju, ostalih 19 mesta predstavljaju takozvane „singleton“ mutacije.

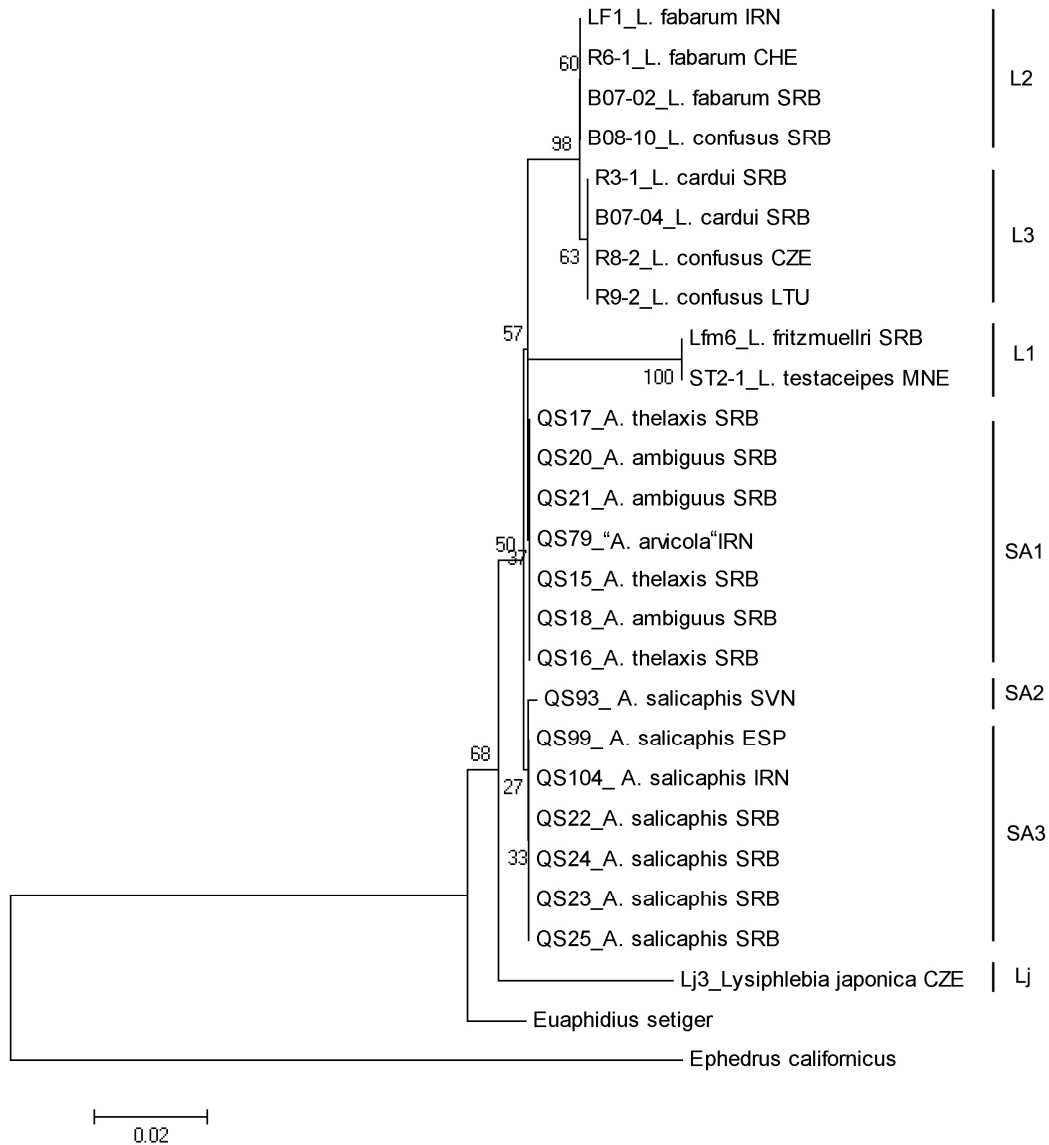
U Tabeli 27 je prikazana šema insercija i delecija nukleotida, pri čemu se može primetiti da su sve jedinke odnosno vrste koherentne po tom pitanju sem vrsta *Lysiphlebus fritzmuelleri* i *L. testaceipes* kao i vrsta *Lysiphlebia japonica*. Vrste *Lysiphlebus fritzmuelleri* i *L. testaceipes* imaju četiri insercije na pozicijama 124, 238, 251 i 252. *Lysiphlebia japonica* ima samo jednu inserciju na mestu 643, dok na mestima 91-95, 100, 117-123 i 148 su delecije nukleotida.

Tabela 27. Mesta insercija i delecija nukleotida nakon poravnanja sekvenci gena za 28S rRNK.

Šifra jedinke	91	92	93	94	95	100	117	118	119	120	121	122	123	124	148	238	251	252	643
QS79_A. arvicola IRN	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS18_A. ambiguus SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS20_A. ambiguus SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS21_A. ambiguus SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS17_A. thelaxis SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS16_A. thelaxis SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS15_A. thelaxis SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS93_A. salicaphis SVN	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS99_A. salicaphis ESP	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS104_A. salicaphis IRN	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS22_A. salicaphis SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS23_A. salicaphis SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS24_A. salicaphis SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
QS25_A. salicaphis SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
LF1_L. fabarum IRN	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
R6-1_L. fabarum CHE	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
B07-02_L. fabarum SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
R3-1_L. cardui SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
B07-04_L. cardui SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
R8-2_L. confusus CZE	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
R9-2_L. confusus LTU	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
B08-10_L. confusus SRB	G	T	T	A	A	T	T	A	A	A	T	T	T	-	T	-	-	-	-
Lfm6_L. fritzmulleri SRB	G	T	T	A	A	T	A	A	A	A	A	T	T	T	T	A	T	A	-
ST2-1_L. testaceipes MNE	G	T	T	A	A	T	A	A	A	A	A	T	T	T	T	A	T	A	-
Lj3_Lysiphebia japonica CZE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T

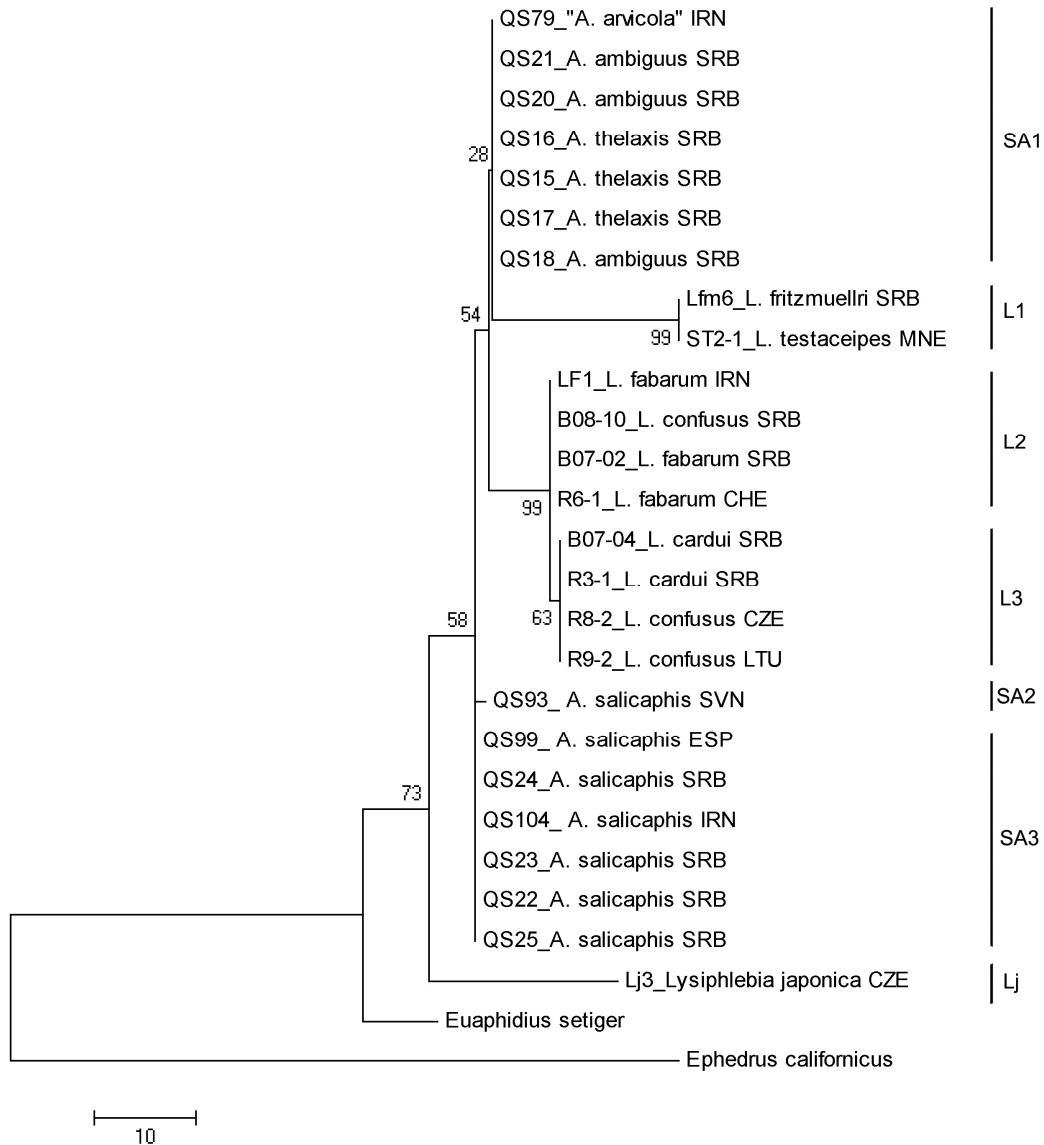
U cilju rekonstrukcije filogenetskih odnosa u okviru podtribusa Lysiphlebina korišćene su metode „Maximum likelihood“ (ML) uz primenu Tamura troparametarskog modela i metode Maksimalne parsimonije (MP). Kao autgrupe su korišćene sekvence jedinki *Euaphidius setiger* i *Ephedrus californicus* koje su preuzete iz banke gena.

Na Slici 14 je prikazano filogenetsko stablo dobijeno ML metodom. Rod *Lysiphlebia* se jasno izdvaja od zajedničke klade koju čine rodovi *Adialytus* i *Lysiphlebus* sa relativno dobrom bootstrap podrškom. Ne tako jasno, na stablu se razdvajaju i rodovi *Adialytus* i *Lysiphlebus*. Međutim, može se primetiti da se haplotipovi SA2 i SA3 koji su predstavljeni jedinkama *A. salicaphis* izdvajaju od klade gde spadaju ostale vrste roda *Adialytus* i *Lysiphlebus*. Rod *Lysiphlebus* obuhvata tri haplotipa, pri čemu su haplotipovi L2 i L3 grupisani u istu kladu, dok haplotip L1 (*L. fritzmuelleri* i *L. testaceipes*) predstavlja sestrinsku grupu zajedno sa haplotipom SA1 koji čine *A. ambiguus* i *A. thelaxis*.



Slika 14. Filogenetsko stablo dobijeno korišćenjem „Maximum likelihood“ metode. „Bootstrap“ metoda sa 1000 ponavljanja je primenjena za testiranje podrške svake od grana. Brojevi iznad grana predstavljaju „bootstrap“ podršku. Na slici je predstavljeno „Bootstrap consensus“ stablo. Troslovna oznaka pored svakog taksona označava državu porekla.

Na Slici 15 je prikazana topologija filogenetskog stabla konstruisanog MP metodom. Sama topologija ovog stabla se suštinski ne razlikuje mnogo od prethodnog. I u ovom slučaju, *L. japonica* je potpuno izdvojena od rodova *Adialytus* i *Lysiphlebus* i formira posebnu kladu.



Slika 15. Jedno od 223 mogućih filogenetskih stabala konstruisanih MP metodom. („Close-Neighbor-Interchange“ algoritam). „Bootstrap“ podrška je prikazana u nivou grananja. Za mesta informativna za parsimoniju indeks konzistencije je 0,816327 a indeks retencije 0,897727. Troslovnna oznaka pored svakog taksona označava državu porekla.

Haplotipovi SA2 i SA3 koji predstavljaju *A. salicaphis* takođe formiraju svoju zasebnu kladu. Međutim, naredna grananja su nešto drugačija od stabla dobijenog ML metodom, a takođe i komplikovanija. Kao što se vidi sa Slike 15. sve vrste roda *Lysiphlebus* (haplotipovi L2 i L3) su grupisane u jednu kladu sem haplotipa L1 (*L. fritzmulleri* i *L. testaceipes*) koji se u ovom slučaju klastira zajedno sa rodnom *Adialytus* tj. haplotipom SA1 (*A. ambiguus* i *A. thelaxis*).

Razlika između analiziranih jedinki, odnosno rodova i vrsta kvantifikovana je Kimurinim dvoparametarskim (K2P) distancama (Tabela 28). Očigledno je da između jedinki *A. ambiguus* i *A. thelaxis* nema razlika, s obzirom na to da predstavljaju jedan haplotip (SA1) dok se od *A. salicaphis* (SA2 i SA3) razlikuju za 0,3%, odnosno 0,2%. Haplotip SA2 koji predstavlja jednu jedinku vrste *A. salcaphis* se od jedinki iste vrste koje pripadaju haplotipu SA3 razlikuju za 0,2%. Što se tiče roda *Lysiphlebus*, i u ovom slučaju se izdvajaju tri haplotipa (L1-L3) pri čemu je L1 predstavljen po jednom jedinkom *L. fritzmulleri* i *L. testaceipes* i razlikuju se od ostala dva za 3,4% (L2), odnosno 3,5% (L3). Haplotip L2, koji čine tri jedinke *L. fabarum* i jedna jedinka *L. confusus*, se razlikuje od haplotipa L3, predstavljen sa po dve vrste *L. cardui* i *L. confusus*, za 0,2%. Genetičke distance između vrste *L. japonica* i svih ostalih haplotipova se kreću u rasponu od 3,2 do 6,1%.

Tabela 28. Matrica K2P distanci nakon „pairwise“ poređenja sekvenci dela gena za 28S rRNK za vrste rodova *Adialytus* (SA1-SA3), *Lysiphlebus* (L1-L3) i *Lysiphlebia* (Lj).

	„A. arv.“							<i>A. ambiguus</i> (3); <i>A. thelaxis</i> (3)							<i>A. salic.</i>	<i>A. salicaphis</i> (6)						<i>L. fabarum</i> (3); <i>L. confusus</i> (1)				<i>L. cardui</i> (2); <i>L. confusus</i> (2)				<i>L. fritzmulleri</i> (1); <i>L. testaceipes</i> (1)		<i>L. japon.</i>
	SA1	SA1	SA1	SA1	SA1	SA1	SA1	SA2	SA3	SA3	SA3	SA3	SA3	SA3	L2	L2	L2	L2	L3	L3	L3	L3	L1	L1	Lj							
SA1																																
SA1	0.000																															
SA1	0.000	0.000																														
SA1	0.000	0.000	0.000																													
SA1	0.000	0.000	0.000	0.000																												
SA1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																											
SA1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																										
SA1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003																									
SA2	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002																								
SA3	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002																							
SA3	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000																						
SA3	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000																					
SA3	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000																				
SA3	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000																			
SA3	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																		
L2	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011																		
L2	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.000																
L2	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.000	0.000															
L2	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.000	0.000	0.000														
L3	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.014	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.002	0.002	0.002	0.002													
L3	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.014	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000												
L3	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.014	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000											
L3	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.014	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000										
L1	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.034	0.034	0.034	0.034	0.035	0.035	0.035	0.035									
L1	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	0.027	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.026	0.034	0.034	0.034	0.034	0.035	0.035	0.035	0.035	0.000								
Lj	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.032	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.042	0.042	0.042	0.042	0.040	0.040	0.040	0.040	0.061	0.061							

Razlike između analiziranih rodova na osnovu genetičkih distanci su prikazane u Tabeli 29. Najveće unutargrupne genetičke razlike su u okviru roda *Lysiphlebus* (0,013), najmanje u okviru roda *Adialytus* (0,001). S obzirom na to da je analizirana samo jedna jedinka roda *Lysiphlebia*, u toj grupi nema genetičkih razlika. Genetičke razlike između rodova *Adialytus* i *Lysiphlebus* su relativno male (0,014) i približno su iste kao i unutargrupne razlike roda *Lysiphlebus*. Međutim, genetičke distance između roda *Lysiphlebia* i rodova *Adialytus* i *Lysiphlebus* su srazmerno velike, i iznose 3,4% i 4,5% (Tabela 29).

Tabela 29. Matrica K2P distanci unutar (zatomnjeno) i između rodova podtribusa Lysiphlebina.

	<i>Adialytus</i>	<i>Lysiphlebus</i>	<i>Lysiphlebia</i>
<i>Adialytus</i>	0,001		
<i>Lysiphlebus</i>	0,014	0,013	
<i>Lysiphlebia</i>	0,034	0,045	0,000

5. DISKUSIJA

Taksonomska istraživanja su od velikog značaja s obzirom na to da imaju bitnog udela u očuvanju i razumevanju biološke raznovrsnosti (Wheeler et al., 2004). Iako su mnoge tradicionalno korišćene metode i dalje u upotrebi, u poslednje vreme je sve veća pažnja usmerena ka modernim metodološkim pristupima, naročito molekularnim metodama. Od posebnog značaja su studije koje podrazumevaju integralni pristup, razmatrajuću istovremeno sve vrste dostupnih informacija (molekularni markeri, morfologija, ekologija, ponašanje, razviće...) za rešavanje taksonomskih problema. Integrativni pristup u taksonomiji je neophodan s obzirom na kompleksnost biologije vrsta, tako da je veoma bitno proučavati granice između vrsta sa više komplementarnih aspekata. Proučavanje inter- i intraspecijske varijabilnost predstavlja srž svih disciplina koje uključuje integrativna taksonomija (Dayrat, 2005; Padial et al., 2010). Međutim, u sistematici i taksonomiji postoji izvesno neslaganje i suprotstavljena mišljenja kada je u pitanju pristup određenim metodološkim naukama i principima (Ebach i Holdrege, 2005; Gregory, 2005). Usled ekspanzije molekularne sistematike, neminovno je došlo i do izvesnih nekonzistentnosti, pre svega u izboru molekularnih markera. Postoje i pokušaji uvođenja reda u molekularnu sistematiku, sa manjim ili većim uspehom (Caterino et al., 2000).

U ovoj studiji su korišćena tri metodološki različita pristupa u cilju ispitivanja varijabilnosti i taksonomskog statusa najčešćih evropskih vrsta roda *Adialytus*. Tradicionalnom morfometrijom su analizirani odnosi dužina i širina određenih karaktera, dok je geometrijskom morfometrijom ispitivana varijabilnost oblika krila. Ispitivanja na molekularnom nivou su bila neophodna kao svojevrsna provera validnosti morfološke varijabilnosti i odnosa morfološke i genetičke varijabilnosti.

Rezultati tradicionalne morfometrije ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika između tri vrste roda *Adialytus*. Od svih analiziranih karaktera, najveću stabilnost pokazuje broj maksilarnih i labijalnih članaka gde nije utvrđena varijabilnost. Sve jedinke su imale konstantan broj maksilarnih članaka, koji u ovom slučaju iznosi tri, a takođe i labijalnih jer sve jedinke imaju samo jedan članak. Ostali meristički

karakteri su, sa druge strane, pokazali izuzetno veliku varijabilnost u odnosu na kontinuirane karaktere.

Broj mirisnih brazdi je naročito varirao na drugom i petom flagelarnom članku antena (F2 i F5). Generalno, jedinke vrsta *A. salicaphis* i *A. thelaxis* imaju relativno veći broj mirisnih brazdi (rinarija) nego jedinke *A. ambiguus*. Ova činjenica može ukazivati na to da se ove dve vrste značajno oslanjaju na dalekosežne, hemijske signale koje koriste pri pronalaženju pogodnog domaćina. Pored rinarija, razlike postoje i u odnosu širine i dužine F1, F2 i F5 članaka. Za sva tri analizirana članka, vrste *A. ambiguus* i *A. salicaphis* imaju skoro identične srednje vrednosti odnosa širine i dužine. Međutim, vrsta *A. thelaxis* je pokazala značajne razlike u odnosu na prethodne dve vrste. Naime, flagelarni članci ove vrste, a naročito peti članak (F5) je više kockast, dok su članci prethodne dve vrste znatno izduženi i štapićastog su oblika. Imajući u vidu ovakve rezultate, antenalni članci mogu poslužiti kao značajan karakter pri razdvajanju vrsta roda *Adialytus*. Pored oblika antenalnih članaka, pri identifikaciji može pomoći i raspored, odnosno položaj seta na samim člancima. Komparativne analize vrsta ovog roda, kao i ključevi za identifikaciju pridaju veliki značaj pomenutim karakteristikama (Starý, 1975; Starý i Rakauskas, 1979; Mescheloff i Rosen, 1990; Rakhshani et al., 2012).

Najveću varijabilnost od kontinuiranih karaktera pokazuje odnos dužina metakarpusa i stigme (MCd/STd). Oblik stigme, koji je određen odnosima njene širine i dužine (STš/STd), ima relativno malu varijabilnost, pri čemu skoro da nema razlika između vrsta *A. ambiguus* i *A. salicaphis*, dok vrsta *A. thelaxis* ima nešto kraću stigmju. S obzirom na to dužina stigme malo varira, očigledno je da dužina metakarpusa (R1 nerv) ima najvećeg udela u razdvajanju analiziranih vrsta.

Kada su maksimalizovane međugrupne, a minimalizovane unutargrupne razlike diskriminantnom kanonijskom analizom, kao nosioci najvećih razlika po prvoj kanonijskoj osi su se izdvojili karakteri: odnos dužina metakarpusa i stigme (MCd/STd), odnos širine i dužine stigme (STš/STd) i broj mirisnih brazdi na prvom flagelarnom članku (F1rn). Upravo na osnovu ovih karaktera je došlo do podele između jedinki vrste *A. ambiguus* sa jedne, i jedinki *A. salicaphis* i *A. thelaxis* sa druge strane (Slika 7). Vrsta *A. thelaxis* se može razlikovati od ostale dve, a naročito od *A. salicaphis*, na osnovu oblika stigme (STš/STd) i odnosa širina mezoskutuma i glave

(MSCš/GLš). Takođe, ovoj razlici znatno doprinose i karakteri kao što su broj mirisnih brazdi na drugom flagelarnom članku (F2rn) kao i oblik petog flagelarnog članka (F5š/F5d) koji je znatno kraći kod *A. thelaxis*.

Na osnovu pojedinih karaktera, odnosno njihovih vrednosti, postoji donekle veća morfološka sličnost između *A. salicaphis* i *A. thelaxis* u odnosu na *A. ambiguus* što se može videti i sa UPGMA dendrograma (Slika 6). Ova sličnost se najviše bazira na dužini R1 nerva koji je znatno duži kod vrste *A. ambiguus*. Uzevši u obzir vrednosti svih analiziranih karaktera, evidentna je generalna morfološka sličnost između *A. ambiguus* i *A. salicaphis*. Međutim, velike razlike u dužini R1 nerva (metakarpusa), koji inače najviše doprinosi razdvajanju vrsta, značajno utiče na topologiju dendrograma. Potencijalnim uključivanjem fenotipa „*A. arvicola*“ i „*A. cf. ambiguus*“ koji se prevashodno odlikuju kraćim R1 nervom od najčešćeg fenotipa *A. ambiguus* (Rakhshani et al., 2012) morfološka slika bi bila znatno drugačija. U tom slučaju, suptilnije razlike analiziranih karaktera bi došle do izražaja i pri tom pomerile morfološku sličnost u korist para *A. ambiguus* i *A. salicaphis*. Nažalost, zbog nedostataka dovoljnog broja jedinki pomenuta dva fenotipa nisu uključeni u morfometrijske analize, već samo u molekularne.

Primenom metode tradicionalne morfometrije utvrđena je varijabilnost svih analiziranih karaktera sem broja maksilarnih i labijalnih članaka. Detektovana varijabilnost je potvrđena kao statistički značajna analizom varijanse (ANOVA) kao i multivarijantnom analizom varijanse (MANOVA). Međutim, zbog relativno male varijabilnosti i slabe uočljivosti razlika, ne mogu se svi analizirani karakteri i koristiti pri razdvajanju i identifikaciji vrsta roda *Adialytus*. Najpogodnije morfološke strukture koje mogu poslužiti za determinaciju do nivoa vrste u okviru roda su: broj mirisnih brazdi na flagelarnim člancima, kao i oblik, odnosno dužina članaka. Takođe, dužina metakarpusa i oblik stigme mogu biti veoma informativni u ovom smislu, premda je neophodno koristiti ovaj karakter u kombinaciji sa prethodno pomenutim kako bi se eliminisala mogućnost greške.

Poznato je da su krila parazitoida od velike važnosti pri traženju domaćina, kao i u ponašanju tokom parenja (Godfray, 1994). Takođe, karakteristike krilne nervature se koriste kao veoma pouzdan taksonomski karakter (Starý, 1970). Rezultati geometrijske morfometrije oblika i veličine prednjih krila su pokazali da izvesni karakteri na krilnoj

ploči mogu biti od koristi pri identifikaciji na specijskom nivou. Ova metoda se pokazala veoma korisnom u rasvetljavanju taksonomskih problema mnogih kompleksa vrsta afidiina (Baylac et al., 2003; Žikić et al., 2009; Mitrovski-Bogdanović et al., 2013, 2014; Tomanović et al., 2013, 2014).

Varijabilnost određenih delova krilne ploče je bila primetna već na grafičkom prikazu konsenzus konstelacije svih tačaka (Slika 8), gde dolazi do znatnog rasipanja homologih tačaka u distalnom delu krila. Ova varijabilnost je potvrđena analizom glavnih komponenti (PCA) pri čemu su se jasno izdvojile jedinke *A. ambiguus* od jedinki druge dve vrste, gde je svakako najviše uticala sama dužina metakarpusa, odnosno R1 nerva. Metoda beskonačno tanke metalne ploče, koja lepo ilustruje deformacije na osnovu veličine vektora određenih tačaka, je iskorišćena kako bi sve te promene bile vizualizirane (Slika 11). Dužina metakarpusa (R1 nerva) bi se u ovom slučaju mogla koristiti sa izvesnom oprežnošću pri razdvajanju vrste *A. ambiguus* od vrsta *A. salicaphis* i *A. thelaxis*. Iako su sve jedinke vrste *A. ambiguus* analizirane geometrijskom morfometrijom imale dugačak metakarpus, koji doseže do gornjeg desnog ugla krilne ploče, ovakav rezultat nas ponekad može navesti na pogrešan zaključak. Naime, već je pomenuto da u okviru vrste *A. ambiguus* postoje fenotipovi sa relativno kraćim R1 nervom, koji su detaljno opisani u studiji koju su objavili Rakhshani et. al. (2012). Na ovaj način postoji mogućnost da se fenotipovi „*A. arvicola*“ i „*A. cf. ambiguus*“ ne samo pomešaju sa ostalim fenotipovima *A. ambiguus*, već i da se pogrešno identifikuju kao *A. salicaphis*, ukoliko se ta identifikacija samo bazira na osnovu dužine metakarpusa. Međutim, pouzdana identifikacija je svakako moguća ukoliko je dostupan veći broj jedinki određene vrste. Pored dužine metakarpusa (R1 nerva), geometrijskom morfometrijom su utvrđene i neke manje uočljive promene u obliku krila. Vrste *A. salicaphis* i *A. thelaxis* imaju znatno širu krilnu ploču u odnosu na *A. ambiguus*, što se može primetiti na osnovu pomeranja tačaka 8-10. Ovakav oblik krila se može dovesti u vezu sa efikasnijom letnom sposobnošću, s obzirom na to da ove dve vrste parazitiraju arborikolne vaši koje se nalaze na listovima vrba, topola i hrastova. Sa druge strane, vrsta *A. ambiguus*, koja ima relativno uska prednja krila, polaže jaja u afidne domaćine koji se pretežno hrane na biljkama iz porodice trava, što ukazuje na smanjenu letnu aktivnost u smislu disperzije na nove jedinke domaćina.

Morfološka sličnost u obliku krila između jedinki *A. salicaphis* i *A. thelaxis* je u skladu sa tradicionalnom morfometrijom, premda u oba slučaja do ovoga dovodi isti

karakter tj. dužina metakarpusa. Međutim, da bismo bili sigurni da ova morfološka sličnost ima i filogenetske implikacije, neophodno je izvršiti i vrednovanje ovog karaktera. Velika varijabilnost u dužini R1 nerva delimično maskira ostale morfološke karaktere i delove krila, te je u ovom slučaju neophodno sagledati morfološku sliku i sa drugog aspekta.

Varijabilnost oblika prednjih krila celog uzorka je najizraženija u distalnom delu krila, gde dolazi do promena u širini i donekle u dužini ovog dela krila. Međutim, proksimalni deo krila pokazuje relativno visoku konzervativnost (Slike 8 i 11.). Slični rezultati variranja oblika (proksimalno-distalno) su zabeleženi kod mnogih vrsta potfamilije Aphidiinae koje su bile podvrgnute metodama geometrijske morfometrije (Žikić et al., 2009; Kos et al., 2011; Mitrovski-Bogdanović et al., 2013, 2014; Tomanović et al., 2013; Petrović et al., 2014). S obzirom na to da se ovakvo stanje sreće kod različitih grupa afidiina, može se očekivati da postoji izvesna modularnost u samom razviću prednjih krila, odnosno da postoji morfološka integracija između proksimalnog i distalnog dela prednjih krila (Klingenberg i Zaklan, 2000; Klingenberg, 2009;).

Pored varijabilnosti na morfološkom nivou, vrlo je bitno i neophodno proveriti da li uočene razlike imaju uporište i na molekularnom nivou. Ovom metodom su analizirane tri vrste roda *Adialytus*, kao i prethodnim dvema metodama. Međutim, u ovom slučaju su uključene i jedinke fenotipova „*A. arvicola*“ i „*A. cf. ambiguus*“ koje nisu analizirane tradicionalnom i geometrijskom morfometrijom zbog nedovoljnog broja jedinki. Izabrani molekularni marker je bio deo mitohondrijalnog gena za citohrom oksidazu 1 (COI) koji se vrlo često koristi za rasvetljavanje srodničkih odnosa između vrsta (Derocles et al., 2012; Mitrovski-Bogdanović et al., 2013; Petrović et al., 2013). Prema Kimurinom dvoparametarskom modelu genetičkih distanci, za insekte se obično smatra da je razlika od 2% dovoljna da dva različita entiteta razmatramo kao dve odvojene, odnosno „dobre“ vrste (Packer et al., 2009; Kim et al., 2012). Međutim, procentualne genetičke razlike ne treba koristiti kao jedini način za razdvajanje vrsta. Pored genetičkih distanci, potrebno je uključiti morfološke karakteristike, kao i ekološke informacije o taksonu pošto jedino ovakvim sintetičkim pristupom možemo dobiti tačne podatke o srodnosti, odnosno razdvajanju vrsta.

Ova studija potvrđuje da je *A. thelaxis* „dobra vrsta“ na osnovu genetičkih distanci analiziranog mtCOI gena, pri čemu se ova vrsta razlikuje od *A. ambiguus* i *A.*

salicaphis za 4,9 odnosno 6%. Ovo je jasno uočljivo i na oba filogenetska stabla (Slika 12 i 13) gde izdvajanje klade *A. thelaxis* ima najveću „bootstrap“ podršku. Sa druge strane, situacija nije toliko jasna kada su u pitanju ostale dve vrste. Iako je filogenetska rekonstrukcija pokazala da je *A. salicaphis* monofiletska grupa, genetička distanca bazirana na anlizi mtCOI gena od 1,4% (opseg od 0,8 do 2,2%) između ove vrste i *A. ambiguus* ukazuje da u ovom slučaju mtCOI gen nije dovoljno informativan u razdvajanju ove dve vrste. „Bootstrap“ podrška razdvajanja klade koju čine jedinke *A. salicaphis* je veoma visoka i iznosi 90% što ukazuje na to da ova vrsta predstavlja monofiletsku grupu. Međutim, *A. ambiguus* je znatno kompleksnija vrsta, kako genetički, tako i morfološki. Ukoliko pogledamo topologiju dobijenih stabala, očigledno je da postoji slaba podrška monofiletskom poreklu ove vrste. Haplotip sa oznakom A1 je bliži *A. salicaphis*, dok haplotip A9 čak nije ni uključen u zajedničku kladu koju čine *A. ambiguus* i *A. salicaphis* već se grupiše van te klade sa relativno visokom „bootstrap“ podrškom. Pomenuti novi fenotipovi „*A. arvicola*“ i „*A. cf. ambiguus*“ se u ovom slučaju nisu izdvojili kao posebna klada, već su uglavnom raspoređeni između ostalih *A. ambiguus* haplotipova bez neke pravilnosti na stablima. Na osnovu svega navedenog, izgleda da ne postoji usklađenost između molekularnih i morfoloških varijacija u okviru vrste *A. ambiguus*. Iako se dva nova fenotipa morfološki razlikuju od ostalih, najčešće sakupljenih jedinki *A. ambiguus* (Rakhshani et al., 2012), genetički su veoma bliski ili čak identični sa drugim jedinkama ove vrste. Prema tome, ne može se prihvatiti bilo kakvo razdvajanje na posebne vrste ili podvrste u okviru *A. ambiguus*. Pojava ovakvih fenotipova potvrđuje da je vrsta *A. ambiguus* morfološki i genetički veoma varijabilna, što ukazuje da ova vrsta poseduje veliku evolutivnu plastičnost.

Vrste *A. ambiguus* i *A. salicaphis* parazitiraju vaši iz iste potfamilije – Chaitophorinae, za razliku od *A. thelaxis* čiji afidni domaćini pripadaju drugoj potfamiliji – Thelaxinae. U tom smislu, prisutni su različiti obrasci u prilagođavanju na afidne domaćine. Sa druge strane, *A. ambiguus* parazitira vaši na zeljastim biljkama (Kavallieratos et al., 2004) dok *A. salicaphis* napada vaši samo na drveću, odnosno na vrbama i topolama (Tomanović et al., 2006) što ukazuje da ove dve vrste, iako genetički vrlo bliske, zauzimaju potpuno različite ekološke niše.

Ova studija je pokazala očigledno nepodudaranje genetičkih sa jedne i morfoloških i ekoloških karakteristika sa druge strane. Ovakvo neslaganje između genetičkih i morfoloških karakteristika se relativno često može javiti kod parazitskih osa

(Quicke i Belshaw, 1999; Tomanović et al., 2013). Jedan od takvih primera je studija koju su objavili Tomanović et. al. (2013) gde ne postoji jasna veza između varijabilnosti „barkoding“ dela mtCOI gena i nivoa morfoloških varijacija u obliku krila blisko srodnih vrsta roda *Aphidius* Nees, 1818. Sličan primer je i *Lysiphlebus fabarum* kompleks vrsta gde takođe nema podudaranja između morfologije i genetičkog diverziteta (Sandrock et al., 2011). Takođe, u ovom slučaju se pokazalo da mtCOI gene nije bio dovoljno informativan u razdvajanju tri morfološki i ekološki različita seksualna/aseksualna taksona – *L. fabarum*, *L. cardui* i *L. confusus* (Sandrock et al., 2011; Derocles et al., 2012). Neslaganje između ekoloških karakteristika i genetičkog diverziteta još uvek nije dovoljno istraženo u okviru potfamilije Aphidiinae. Interesantan je i primer vrsta *Aphidius microlophii* Pennacchio & Tremblay, 1987 i *A. ervi* Haliday 1834. Iako su ove dve vrste morfološki veoma slične, sa ekološkog stanovišta one su potpuno odvojene. *A. microlophii* parazitira samo *Microlophium carnosum* (Buckton, 1876) (Pennacchio i Tremblay, 1986) i vrstu *Wahlgreniella assiannilssoni* Hille Ris Lambres, 1949 (Petrović et al., 2006), dok vrsta *A. ervi* parazitira veliki broj vrsta afidnih domaćina ali ne i prethodne dve vrste vaši. Analiza sekvenci mtCOI gena je pokazala da nema razlika između ova dva parazitoida (Derocles et al., 2012) iako je pouzdano potvrđeno da postoji značajna reproduktivna izolacija između njih (Tremblay i Pennacchio, 1988).

Pored kongeneričkih molekularnih analiza roda *Adialytus*, u ovoj studiji su analizirani i odnosi u okviru podtribusa Lysiphlebina, odnosno srodničke relacije između tri roda ovog podtribusa. Ribozomalni gen za 28S rRNK, odnosno njegov D2 region, je pouzdano korišćen u rasvetljavanju filogenije na nivou rodova, tribusa i potfamilija (Belshaw i Quicke, 1997; Dowton i Austin, 1998). Ono što karakteriše ovaj gen, je njegova veća konzervativnost u odnosu na, recimo mtCOI gen, pa kao takav može poslužiti u analizama na nivou tribusa i podtribusa.

Na osnovu rezultata koji su dobijeni analizom D2 regiona ovog gena, rod *Lysiphlebia* se sa visokom „bootstrap“ podrškom izdvaja od klade koju čine rodovi *Adialytus* i *Lysiphlebus*, i to na oba stabla dobijena ML i MP metodama (Slika 14 i 15). Genetička udaljenost ovog roda je primetna i ukoliko pogledamo insercije, odnosno delecije nukleotida. U ovom slučaju, rod *Lysiphlebia* ima čak 14 delecija nukleotida i jednu inserciju u odnosu na većinu jedinki ostala dva roda. Međutim, odnos između rodova *Adialytus* i *Lysiphlebus* su znatno kompleksniji, što je i očigledno sa topologije

oba filogenetska stabla. Suprotno očekivanjima, došlo je do izvesnog preklapanja, odnosno mešanja između vrsta roda *Adialytus* i *Lysiphlebus*. Oba roda su donekle podeljena na dve zasebne linije, pri čemu linija koju čini vrsta *A. salicaphis* sa dva haplotipa (SA2 i SA3) predstavlja sestrinsku grupu kladi koja uključuje ostale dve vrste roda *Adialytus* i sve vrste roda *Lysiphlebus*. Sa druge strane, klada predstavljena haplotipom L1 (*L. fritzmuelleri* i *L. testaceipes*) je bliža haplotipu SA1 koju čine vrste *A. ambiguus* i *A. thelaxis*, nego ostalim vrstama roda *Lysiphlebus*. Ukoliko pogledamo vrednosti K2P genetičkih distanci (Tabela 29), jasno je da je unutargrupna distanca roda *Lysiphlebus* skoro ista kao i genetička distanca između *Adialytus* i *Lysiphlebus*. Ovo nedvosmisleno ukazuje na veliku genetičku bliskost između ova dva roda. Ovakvi rezultati molekularne analize su donekle u skladu sa ranijom praksom svrstavanja roda *Adialytus* u okviru roda *Lysiphlebus* (Starý, 1975). Međutim, kao što je već pomenuto, ne treba se oslanjati isključivo na jednu vrstu izvora informacija o varijabilnosti odnosno sličnosti/različitosti, s obzirom na to da se ova dva roda jasno razlikuju morfološki, a naročito u nervaturi krila.

Veoma slični odnosi u okviru *Lysiphlebina* su dobijeni i analizom ribozomalnog gena za 18SrRNK u filogenetskoj studiji afidiina koju su uradili Sanchis et al. (2000). Kao predstavnike *Lysiphlebina* su koristili *A. ambiguus*, *A. salicaphis* i četiri vrste roda *Lysiphlebus* (*L. cardui*, *L. confusus*, *L. fabarum* i *L. testaceipes*). Ispostavilo se da je vrsta *A. salicaphis* na isti način izdvojena iz zajedničke klade gde su ostale vrste roda *Lysiphlebus*, ali i vrsta *A. ambiguus* [videti Slike 3 i 4 u Sanchis et al. (2000)]. U tom slučaju se *A. ambiguus* grupiše zajedno sa vrstom *L. cardui*, drugu kladu formiraju *L. confusus* i *L. fabarum*, dok *L. testaceipes* formira zasebnu granu, što je u skladu sa rezultatima analize gena 28S rRNK koji je dobijeni u ovoj studiji.

Pored većeg broja slučajeva gde se ovaj molekularni marker uspešno pokazao u razdvajanju viših taksonomskih kategorija od nivoa vrste, postoje i neki slučajevi gde 28S rRNK nije bio dovoljno informativan u tom smislu. Jedna od takvih studija je analiza filogenetskih odnosa između rodova potfamilije Microgastrinae (Braconidae) koju su sproveli Mardulyn i Whitfield (1999). Pored gena za 28S rRNK, u navedenom radu su korišćeni i gen za 16S rRNK, kao i mtCOI gen. Sva tri molekularna markera nisu bila dovoljno informativna, pri čemu je uočeno slabo razdvajanje između rodova, dok su „bootstrap“ vrednosti većine grana bile izuzetno niske. Prema Mardulyn i Whitfield (1999) ovakvo stanje ukazuje da se u okviru potfamilije Microgastrinae desila

rapidna specijacija koja maskira efikasnost gena za 28S rRNK, s obzirom da se ovaj marker naročito dobro pokazao u analizi mnogih grupa Hymenoptera (Belshaw i Quicke, 1997; Gimeno et al., 1997; Xue-Xin et al., 2003).

Interesantno je da jedinke *A. ambiguus* i *A. thelaxis* predstavljaju isti haplotip koji se razlikuje od jedinki *A. salicaphis*, predstavljen sa dva haplotipa. Ovakav rezultat je potpuno suprotan dobijenim rezultatima analizom mtCOI gena. Jedno od mogućih objašnjenja ovakvog fenomena je relativno brza diverzifikacija u okviru roda *Adialytus*, pri čemu je došlo do izvesnog zasićenja nukleotidnih razlika u brzoevoluirajućim sekvencama kao što je mtCOI gen, dok u sekvencama konzervativnijih gena nije došlo do formiranja nikakvih razlika. Izdvajanje *A. salicaphis* klade van ostalih pripadnika rodu *Adialytus*, pa čak i van roda *Lysiphlebus*, ukazuje na parafiletsko poreklo ovog roda.

Iako su donekle malo bolje sagledane filogenetske relacije između rodova podtribusa Lysiphlebina, ova studija otvara i neka nova pitanja o poreklu pojedinih taksona u okviru podtribusa. Ovo se naročito odnosi na rod *Lysiphlebus*, koji sa znatno većim brojem vrsta u odnosu na ostala dva roda predstavlja mnogo kompleksniju grupu sa još uvek nerazjašnjenim srodničkim relacijama. To svakako ostavlja puno prostora za neka nova istraživanja koja treba sprovesti kako na morfološkom, tako i na molekularnom nivou uz korišćenje adekvatnih molekularnih markera.

6. ZAKLJUČCI

1. Upotrebom „tradicionalne“ morfometrije utvrđena je statistički značajna varijabilnost između tri analizirane vrste roda *Adialytus*. Najveću varijabilnost su pokazali karakteri kao što je broj mirisnih brazdi na prvom, drugom i petom flagelarnom članku antena. Takođe, značajne razlike su uočene i u samim proporcijama analiziranih flagelarnih članaka. Vrsta *A. thelaxis* ima znatno kraće i šire flagelarne segmente u odnosu na *A. ambiguus* i *A. salicaphis*.
2. Pored antena, veliku varijabilnost u uzorku pokazuju i prednja krila. Naročito je varijabilna dužina R1 nerva (metakarpus) i oblik stigme. Vrsta *A. ambiguus* ima znatno duži R1 nerv u odnosu na vrste *A. salicaphis* i *A. thelaxis*.
3. Karakteri koji najviše doprinose razdvajanju taksona su odnos dužine metakarpusa i stigme (MCd/STd), odnos širine i dužine stigme (STš/STd) i broj mirisnih brazdi na prvom flagelarnom članku antena (F1rn).
4. Najstabilniji analizirani karakteri su broj maksilarnih (MP) i labijalnih (LP) palpusa. Sve jedinke su imale tri maksilarna i jedan labijalni palpus.
5. Geometrijskom morfometrijom detektovane su izvesne razlike u obliku prednjih krila. Distalni deo krila ima znatno veću varijabilnost u odnosu na proksimalni. Jedinke *A. ambiguus* imaju relativno uska krila i dugačak metakarpus, za razliku od *A. salicaphis* i *A. thelaxis*.
6. Na osnovu analize oblika prednjih krila, pojedini karakteri na krilnoj ploči, kao što je dužina metakarpusa i širina krila u distalnom delu, se mogu koristiti za razdvajanje na specijskom nivou, međutim isključivo u kombinaciji sa drugim morfološkim karakterima.
7. Molekularnom analizom na osnovu mtCOI gena potvrđeno je da je *A. thelaxis* „dobra“ vrsta. Genetičke razlike između *A. ambiguus* i *A. salicaphis* su relativno male i ispod graničnih vrednosti za specijsko razdvajanje. *A. salicaphis* klada je veoma koherentna, dok se neki haplotipovi *A. ambiguus* klastriraju izvan glavne klade ove vrste.

8. Fenotipovi označeni kao „*A. arvicola*“ i „*A. cf. ambiguus*“ se ne izdvajaju posebno, već su klastirani unutar klade *A. ambiguus*. Takođe, K2P distance su minimalne ili su im sekvence čak identične kao i sekvence jedinki najčešćeg fenotipa *A. ambiguus*. Stoga, ne možemo prihvatiti izdvajanje ovih fenotipova u smislu izdizanja na nivo vrste, čak ni podvrste.
9. Vrsta *A. ambiguus* je veoma kompleksna u genetičkom i morfološkom pogledu. Međutim, ne postoji usklađenost između morfološke i genetičke varijabilnosti.
10. Vrste *A. ambiguus* i *A. salicaphis* su veoma bliske, kako na morfološkom, tako i na genetičkom nivou. Međutim, one se ipak dosta razlikuju u ekološkom smislu, s obzirom na to da zauzimaju posebne ekološke niše i prazitiraju različite domaćine.
11. Analiza na generičkom nivou u okviru podtribusa *Lysiphlebina* korišćenjem ribozomalnog gena za 28S rRNK je pokazala da se rod *Lysiphlebia* izdvaja sa visokom podrškom od zajedničke klade koju čine rodovi *Adialytus* i *Lysiphlebus*. Međutim poslednja dva roda su veoma bliska i razdvajanje nije jasno definisano.
12. Vrste *A. ambiguus* i *A. thelaxis* predstavljaju isti haplotip na osnovu analize gena za 28S rRNK, dok se *A. salicaphis* izdvaja kao posebna klada van zajedničke klade gde spadaju vrste roda *Lysiphlebus* i ostale vrste roda *Adialytus*. Ovo ukazuje na moguće parafiletsko poreklo roda *Adialytus*.

7. LITERATURA

- Achterberg, C.v., 1976. Preliminary key to the subfamilies of the Braconidae (Hymenoptera). *Tijdschrift voor entomologie*. 119, 37-78.
- Achterberg, C.v., 1984. Essay on the phylogeny of Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Entomologisk Tidskrift*. 105, 41-58
- Achterberg, C.v. 2013. Fauna Europaea: Hymenoptera: Symphyta + Ichneumonoidea. In Fauna Europaea version 2.6, URL <http://www.faunaeur.org>.
- Arthur, A., 1971. Associative learning by *Nemeritis canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *The Canadian Entomologist*. 103, 1137-1141.
- Askew, R., Shaw, M.R., 1986. Parasitoid communities: their size, structure and development. In: Waage, J and Greathead, D (eds), *Insect Parasitoids*, 13th Symposium of Royal Entomological Society of London, pp. 225-264.
- Askew, R.R., 1971. Parasitic insects. London. 316pp.
- Atanassova, P., 1997. Checklist of the subfamily Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) from Bulgaria. *Zoologische Mededeelingen*. 71, 287-290.
- Baylac, M., Villemant, C., Simbolotti, G., 2003. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society*. 80, 89-98.
- Beckage, N.E., Gelman, D.B., 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. *Annual Reviews in Entomology*. 49, 299-330.
- Belokobylskij, S.A., Kula, R.R., 2012. Review of the brachypterous, micropterous, and apterous Braconidae of the cyclostome lineage (Hymenoptera: Ichneumonoidea) from the Palearctic Region. *Zootaxa*. 3240, 1-62.

- 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.
- Belshaw, R., Quicke, D.L., 1997. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 7, 281-293.
- Belshaw, R., Quicke, D.L., 2002. Robustness of ancestral state estimates: evolution of life history strategy in ichneumonoid parasitoids. *Systematic Biology*. 51, 450-477.
- Bookstein, F.L., 1997a. Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical image analysis*. 1, 225-243.
- Bookstein, F.L., 1997b. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press.
- 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.
- Brajković, M., 1989a. Knowledge of the Braconidae (Hymenoptera) fauna in Yugoslavia. *Glasnik Prirodnjačkog muzeja, B.* 43/44, 127-138.
- Brajković, M., 1989b. Parazitske ose (Hymenoptera: Braconidae); Usporedno morfološka studija usnih i genitalnih struktura, sistematika i filogenija. Naučna knjiga, Beograd. 99pp.
- Calvert, D.J., Van den Bosch, R., 1972. Host range and specificity of *Monoctonus paulensis* (Hymenoptera: Braconidae) a parasite of certain dactynotine aphids. *Annals of the Entomological Society of America*. 65, 422-432.
- Campbell, B., Steffen-Campbell, J., Werren, J., 1994. 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.

- Čapek, M., 1970. A new classification of the Braconidae (Hymenoptera) based on the cephalic structures of the final instar larva and biological evidence. *The Canadian Entomologist*. 102, 846-875.
- Caterino, M.S., Cho, S., Sperling, F.A., 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual review of entomology*. 45, 1-54.
- Chou, L., 1984. The phylogeny of Aphidiidae (Hymenoptera) of Taiwan. *Chung-hua nung yeh yen chiu= Journal of agricultural research of China*. 33, 437-446.
- 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.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85, 407-415.
- 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., 1998. Phylogenetic relationships among the microgastroid wasps (Hymenoptera: Braconidae): combined analysis of 16S and 28S rDNA genes and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10, 354-366.
- Dowton, M., Belshaw, R., Austin, A.D., Quicke, D.L., 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.
- Ebach, M.C., Holdrege, C., 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy.
Nature. 434, 697-697.
- 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.
- Eidmann, H., 1924. Die Eiablage von *Trioxys* Hal.(Hym., Braconidae) nebst
Bemerkungen über die wirtschaftliche Bedeutung dieses Blattlausparasiten.
Zeitschrift für Angewandte Entomologie. 10, 353-363.
- 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.
- Finlayson, T., 1990. The systematics and taxonomy of final instar larvae of the family
Aphidiidae (Hymenoptera). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*.
122, 3-74.
- Gahan, A.B., 1910. Some synonymy and other notes on Aphidiinae. *Proceedings of the
Entomological Society of Washington*. 12, 179-189.
- Gärdenfors, U., 1986. Taxonomic and biological revision of palearctic *Ephedrus*
Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Entomologica Scandinavica*.
21, 5-95.
- Gauld, I.D., 1988. Evolutionary patterns of host utilization by ichneumonoid parasitoids
(Hymenoptera: Ichneumonidae and Braconidae). *Biological Journal of the
Linnean Society*. 35, 351-377.
- Gibson, G.A., 1985. Some pro and mesothoracic structures important for phylogenetic
analysis of Hymenoptera, with a review of terms used for the structures. *The
Canadian Entomologist*. 117, 1395-1443.

- Gimeno, C., Belshaw, R., Quicke, D., 1997. Phylogenetic relationships of the Alysiinae/Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) and the utility of cytochrome b, 16S and 28S D2 rRNA. *Insect molecular biology*. 6, 273-284.
- Godfray, H.C.J., 1994. Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press.
- Goldson, S., McNeill, M., Phillips, C., Proffitt, J., 1992. Host specificity testing and suitability of the parasitoid *Microctonus hyperodae* (Hym.: Braconidae, Euphorinae) as a biological control agent of *Listronotus bonariensis* (Col.: Curculionidae) in New Zealand. *Entomophaga*. 37, 483-498.
- Gregory, T.R., 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*. 434, 1067-1067.
- 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., Hofsvang, T., 1991. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphidiidae): biology, host selection and use in biological control. *Biocontrol News and Information*. 12, 13-42.
- 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., Stary, P., 2011. Two new species of aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) from the Balkan Peninsula. *Zootaxa*. 2895, 58-64.
- Kavallieratos, N.G., Tomanović, Ž., 2001. Some rare and endemic aphid parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) from the Balkan Peninsula. *Acta Entomologica Serbica*. 6, 121-129.
- Kavallieratos, N.G., Tomanović, Ž., Stary, P., Athanassiou, C.G., Sarlis, G.P., Petrović, O., Niketić, M., Veroniki, M.A., 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.
- Kim, D.-W., Yoo, W.G., Park, H.C., Yoo, H.S., Kang, D.W., Jin, S.D., Min, H.K., Paek, W.K., Lim, J., 2012. DNA barcoding of fish, insects, and shellfish in Korea. *Genomics & informatics*. 10, 206-211.
- Klingenberg, C.P., 2009. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating a priori hypotheses. *Evolution & development*. 11, 405-421.
- Klingenberg, C.P., Zaklan, S.D., 2000. Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution*. 54, 1273-1285.
- Kos, K., Petrović, A., Starý, P., Kavallieratos, N., 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, 1221-1232.
- Le Ralec, A., Anselme, C., Outreman, Y., Poirié, M., Van Baaren, J., Le Lann, C., Van Alphen, J.J.M., 2010. Evolutionary ecology of the interactions between aphids and their parasitoids. *Comptes rendus biologies*. 333, 554-565.
- Mackauer, M., 1961. Die Gattungen der Familie Aphidiidae und ihre verwandtschaftliche Zuordnung (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Beiträge zur Entomologie*. 11, 792-803.
- Mackauer, M., 1965. Parasitological data as an aid in aphid classification. *The Canadian Entomologist*. 97, 1016-1024.

- Mackauer, M., Ferriere, C., van der Vecht, J., 1968. Hymenopterorum catalogus, Vol 3. Dr. Junk.
- Mackauer, M., Michaud, J., Völkl, W., 1996. Host choice by aphidiid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae): host recognition, host quality, and host value. *The Canadian Entomologist*. 128, 959-980.
- Mackauer, M., Starý, P., 1967. World Aphidiidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). Le Francois. Paris, 195 pp.
- Mardulyn, P., Whitfield, J.B., 1999. Phylogenetic signal in the COI, 16S, and 28S genes for inferring relationships among genera of Microgastrinae (Hymenoptera; Braconidae): evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 12, 282-294.
- Marsh, P., 1979. Family Braconidae. *Catalog of Hymenoptera in America north of Mexico*. 1, 144-295.
- Marsh, P., 1991. Description of a phytophagous doryctine braconid from Brazil (Hymenoptera: Braconidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington (USA)*.
- Matsuda, R., 1958. On the origin of the external genitalia of insects. *Annals of the Entomological Society of America*. 51, 84-94.
- Mescheloff, E., Rosen, D., 1990. Biosystematic studies on the Aphidiidae of Israel (Hymenoptera: Ichneumonoidea). 3. The genera *Adialytus* and *Lysiphlebus*. *Israel Journal of Entomology*. 24, 35-50.
- Messing, R., AliNiasee, M., 1989. Introduction and establishment of *Trioxys pallidus* (Hym.: Aphidiidae) in Oregon, USA for control of filbert aphid *Myzocallis coryli* (Hom.: Aphididae). *Entomophaga*. 34, 153-163.
- Michaud, J.P., Mackauer, M., 1995. Oviposition behavior of *Monoctonus paulensis* (Hymenoptera: Aphidiidae): factors influencing reproductive allocation to hosts and host patches. *Annals of the Entomological Society of America*. 88, 220-226.

- Michaud, J.P., 2002 Classical biological control: a critical review of recent programs against citrus pests in Florida. *Annals of the Entomological Society of America*. 95, 531-540.
- Michaud, J.P., Mackauer, M., 1994. The use of visual cues in host evaluation by aphidiid wasps: I. Comparison between three *Aphidius* parasitoids of the pea aphid. *Entomologia experimentalis et applicata*. 70, 273-283.
- Michelena, J., González, P., Soler, E., 2004. Parasitoides afífinos (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) de pulgones de cultivos agrícolas en la Comunidad Valenciana. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*. 30, 317-326.
- Mitić-Mužina, N., Srđić, Z., 1977. Rasprostranjenost i prirodni neprijatelji *Macrosiphum (Sitobion) avenae* Fabr.(Homoptera: Aphidoidea) u Jugoslaviji. *Zaštita bilja*. 28, 255-267.
- Mitrović, M., Petrović, A., Kavallieratos, N.G., Starý, P., Petrović-Obradović, O., Tomanović, Ž., Vorburger, C., 2013. Geographic structure with no evidence for host-associated lineages in European populations of *Lysiphlebus testaceipes*, an introduced biological control agent. *Biological Control*. 66, 150-158.
- 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.
- Mitrovski-Bogdanović, A., Tomanović, Ž., Mitrović, M., Petrović, A., Ivanović, A., Žikić, V., Starý, P., Vorburger, C., 2014. The *Praon dorsale-yomenae* s. str. complex (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae): Species discrimination using geometric morphometrics and molecular markers with description of a new species. *Zoologischer Anzeiger- A Journal of Comparative Zoology*. 253, 270-282.
- Mohyuddin, A., Inayatullah, C., King, E., 1981. Host selection and strain occurrence in *Apanteles flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) and its bearing on

- biological control of graminaceous stem-borers (Lepidoptera: Pyralidae). *Bulletin of Entomological Research*. 71, 575-581.
- O'Donnell, D., 1989. A morphological and taxonomic study of first instar larvae of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Systematic Entomology*. 14, 197-219.
- Overholt, W., Ngi-Song, A., Kimani, S., Mbapila, J., Lammers, P., Kioko, E., 1994. Ecological considerations of the introduction of *Cotesia flavipes* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae) in Africa. *Biocontrol News and Information*. 15, 19-24.
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., Hanner, R., 2009. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*. 9, 42-50.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M., 2010. Review: The integrative future of taxonomy. *Front Zool*. 7, 1-14.
- Papp, J., 1973. Contributions to the braconid fauna of Yugoslavia (Hymenoptera, Braconidae). *Acta Izd Prirodonaucn Muz*.
- Papp, J. 2009. Contribution to the braconid fauna of the former Yugoslavia, V. Ten subfamilies *Entomofauna*.
- Pennacchio, F., Tremblay, E., 1986. Biosystematic and morphological study of two *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae) 'biotypes' with the description of a new species. *Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria" Filippo Silvestri", Italy*. 43, 105-117.
- Petrović, A., Mitrović, M., Starý, P., Petrović-Obradović, O., Žikić, V., Tomanović, Ž., Vorburger, C., 2013. *Lysiphlebus orientalis* (Hymenoptera, Braconidae), a new invasive aphid parasitoid in Europe—evidence from molecular markers. *Bulletin of Entomological Research*. 103, 451-457.
- Petrović, A., Tomanović, Ž., Kavallieratos, N.G., Mitrovski-Bogdanović, A., Starý, P., Ivanović, A., 2014. Sexual dimorphism in the parasitoid wasps *Aphidius balcanicus*, *Aphidius rosae*, and *Aphidius urticae* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Annals of the Entomological Society of America*. 107, 1027-1032.

- Petrović, A., Tomanović, Ž., Žikić, V., 2006. *Wahlgreniella ossiannilssoni* Hille Ris Lambers, a new host for *Aphidius microlophii* Pennacchio and Tremblay (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Archives of Biological Sciences*. 58, 41-42.
- Petrović, A., Tomanović, Ž., Žikić, V., Kavallieratos, N.G., Starý, P., 2009. New records of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) from Serbia and Montenegro. *Acta entomologica serbica*. 14, 219-224.
- Petrović, O., 1992. Prva zapažanja prisustva *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera, Aphididae) u Srbiji. *Zaštita bilja*. 43, 145-147.
- Pike, K., 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, 688-740.
- Poirié, M., Carton, Y., Dubuffet, A., 2009. Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. *Comptes rendus biologiques*. 332, 311-320.
- Quicke, D., van Achterberg, C., 1990. Phylogeny of the subfamilies of the family Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). Nationaal Natuurhistorisch Museum.
- Quicke, D.L., 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.
- Rakhshani, E., Starý, P., Tomanović, Ž., 2012. Species of *Adialytus* Förster, 1862 (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) in Iran: taxonomic notes and tritrophic associations. *ZooKeys*. 221, 81-95.
- Read, D.P., Feeny, P.P., Root, R.B., 1970. Habitat selection by the aphid parasite *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) and hyperparasite *Charips brassicae* (Hymenoptera: Cynipidae). *The Canadian Entomologist*. 102, 1567-1578.

- 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.
- Rohlf, F.J., Marcus, L.F., 1993. A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*. 8, 129-132.
- Sanchis, A., Latorre, A., González-Candelas, F., Michelena, J.M., 2000. An 18S rDNA-based molecular phylogeny of Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 14, 180-194.
- Sandrock, C., Schirrmeyer, B.E., Vorburger, C., 2011. Evolution of reproductive mode variation and host associations in a sexual-aseexual complex of aphid parasitoids. *BMC Evolutionary Biology*. 11, 348.
- Schlinger, E.I., Hall, J.C., 1961. The biology, behavior, and morphology of *Trioxys* (*Trioxys*) *utilis*, an internal parasite of the spotted alfalfa aphid, *Therioaphis maculata* (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae). *Annals of the Entomological Society of America*. 54, 34-45.
- Scudder, G., 1961. The comparative morphology of the insect ovipositor. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*. 113, 25-40.
- Sharkey, M., 1993. Family Braconidae. Hymenoptera of the world: An identification guide to families. Agriculture Canada, 362-395.
- Shaw, M., Huddleston, T., 1991. Classification and biology of braconid wasps. Handbooks for the identification of British insects 7.
- Sheehan, W., Shelton, A., 1989. Parasitoid response to concentration of herbivore food plants: Finding and leaving plants. *Ecology*. 70, 993-998.
- Sheets, D. 2003. MakeFan6 (Department of Physics, Canisius College, Buffalo, NY).
- 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.

- Smith, C.F., 1944. The Aphidiinae of North America (Braconidae: Hymenoptera). Ohio State University, Columbus.
- Smith, P.T., Kambhampati, S., Volkl, W., Mackauer, M., 1999. A phylogeny of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) inferred from mitochondrial NADH 1 dehydrogenase gene sequence. *Mol Phylogenet Evol.* 11, 236-245.
- Snodgrass, R.E., 1941. The male genitalia of Hymenoptera, Vol 3599. Smithsonian Institution.
- Stanković, S.S., Starý, P., Mifsud, D., 2013. Aphids and their parasitoids on the Canary grass, *Phalaris canariensis* in Malta (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Bulletin of the entomological society of Malta.* 137-141.
- Starý, P., 1966a. Aphid parasites (Hym., Aphidiidae) and their relationship to aphid attending ants, with respect to biological control. *Insectes Sociaux.* 13, 185-202.
- Starý, P., 1966b. The Aphidiidae of Italy (Hymenoptera Ichneumonoidea). Compositori.
- Starý, P., 1961. Taxonomic notes on the genus *Lysiphlebus* Förster (Hymenoptera: Aphidiidae). *Bulletin entomologique de Pologne.* 31, 97-103.
- Starý, P., 1970. Biology of aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) with respect to integrated control, Vol 6. Dr. W. Junk b.v., The Hague., 643 p.
- Starý, P., 1975. The subgeneric classification of *Lysiphlebus* Förster, 1862 (Hymenoptera, Aphidiidae). *Annotationes Zoologicae et Botanicae.* 1-9.
- Starý, P., 1981. On the strategy, tactics and trends of host specificity evolution in aphid parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca.* 78, 65-75.
- Starý, P., 1988. Aphidiidae. In “Aphids, their biology, natural enemies and control” (A. K. Minks and P. Harrewijn). Elsevier Editorial System. Amsterdam. 2B, 171-184.
- Starý, P., Juchnevič, L., 1978. Aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) from Kazakhstan, USSR. *Bulletin Entomologique de Pologne.* 48, 523-532.

- Starý, P., Lumbierres, B., Pons, X., 2004. Opportunistic changes in the host range of *Lysiphlebus testaceipes* (Cr.), an exotic aphid parasitoid expanding in the Iberian Peninsula. *Journal of Pest Science*. 77, 139-144.
- Starý, P., Lyon, J., 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., Rakauskas, R., 1979. *Adialytus balticus* sp. n., a parasitoid of *Dysaphis anthrisci* from the east Baltic (Hymenoptera, Aphidiidae; Homoptera, Aphididae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*. 76, 313-317.
- Starý, P., Schlinger, E.I., 1967. Revision of the Far East Asian Aphidiidae (Hymenoptera), Vol 3. Dr. W. Junk, Den Haag, 204 p.
- Starý, P., Tomanović, Ž., Petrović, O., 1998. A new parasitoid of root-feeding aphids from the Balkan mountains (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Deutsche entomologische zeitschrift*. 45, 175-179.
- Takada, H., 1979. Aphidiidae (Hymenoptera) from Mongolia. *Folia Entomologica Hungarica*. 32, 189-202.
- 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.
- Tobias, V., 1967. A review of the classification, phylogeny and evolution of the family Braconidae (Hymenoptera). *Entomologicheskoe Obozrenie (Entomological Review)*. 46, 645-669.
- Tobias, V., Kyriak, I., 1971. *Areopraon pilosum* Mackauer 1959, and problems concerning phylogeny and distribution of the family Aphidiidae (Hymenoptera). *Entomologicheskoe Obozrenie (Entomological Review)*. 50, 11-16.

- Tobias, V.I., 1989. On use of the method of the phylogenetic analysis of W. Hennig for construction of phylogenetic tree of family Braconidae (Hymenoptera). *Trudy Zoologicheskogo Instituta*. 202, 67-86.
- Todorov, O., 2007. Studies on the subfamily Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) of Bulgaria. *Acta zoologica bulgarica*. 59, 289-293.
- Tomanović, Ž., 1994. Parazitske ose i njihov uticaj na sezonsku dinamiku lucerkine vaši *Acirthosiphon pisum* (Harr.) (Aphididae: Homoptera). Beograd.
- Tomanović, Ž., 2001. *Aphidius linosiphonis* sp. n. (Hymenoptera; Braconidae; Aphidiinae), a new member of the aphid parasitoid guild associated with *Galium*. *Zootaxa*. 6, 1-4.
- Tomanović, Ž., Brajković, M., 2001. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphidiidae) of agroecosystems of the south part of the Pannonian area. *Archives of Biological Sciences*. 53, 57-64.
- Tomanović, Ž., Kavallieratos, N., 2002. *Trioxys* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Serbia and Montenegro. *Acta entomologica serbica*. 7, 67-81.
- Tomanović, Ž., Kavallieratos, N., Stary, P., Athanassiou, C., Žikić, V., Petrović-Obradović, O., Sarlis, G., 2003. *Aphidius* Nees aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) in Serbia and Montenegro: tritrophic associations and key. *Acta entomologica serbica*. 8, 15-39.
- Tomanović, Ž., Kavallieratos, N., Stary, P., Petrović-Obradović, O., Tomanović, S., Jovanović, S., 2006. Aphids and parasitoids on willows and poplars in southeastern Europe (Homoptera: Aphidoidea; Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae). *Journal of Plant Diseases and Protection*. 113, 174-180.
- 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, Ž., Kavallieratos, N.G., Athanassiou, C.G., Stanisavljević, L.a.Ž., 2003. A review of the West Palaearctic aphidiines (Hymenoptera: Braconidae:

- Aphidiinae) parasitic on *Uroleucon* spp., with the description of a new species. In: *Annales de la Société entomologique de France*, pp. 343-353.
- Tomanović, Ž., Kavallieratos, N.G., Starý, P., Petrović-Obradović, O., Athanassiou, C.G., Stanisavljević, L.Ž., 2008. Cereal aphids (Hemiptera: Aphidoidea) in Serbia: seasonal dynamics and natural enemies. *European Journal of Entomology*. 105, 495-501.
- Tomanović, Ž., Kavallieratos, N.G., Starý, P., Stanisavljević, L.Ž., Petrović-Obradović, O., Tomanović, S., Milutinović, M., 2006. Phylogenetic relationships among *Praon* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) aphid parasitoids, with redescription of two species. *Insect systematics & evolution*. 37, 213-226.
- Tomanović, Ž., Kos, K., Petrović, A., Starý, P., Kavallieratos, N., 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-A Journal of Comparative Zoology*. 252, 41-47.
- Tomanović, Ž., Petrović, A., Kavallieratos, N.G., Starý, P., Toševski, I., Bogdanović, A.M., 2009. *Areopraon chaitophori* n. sp. (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) associated with *Chaitophorus leucomelas* Koch on poplars, with a key for European *Areopraon* Mackauer species. *Annales de la Société Entomologique de France*. 45, 187-192.
- Tomanović, Ž., Petrović, A., Mitrović, M., Kavallieratos, N., Starý, P., Rakhshani, E., Rakhshanipour, M., Popović, A., Shukshuk, A., Ivanović, A., 2014. Molecular and morphological variability within the *Aphidius colemani* group with redescription of *Aphidius platensis* Brethes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Bulletin of Entomological Research*. 104, 552-565.
- Tremblay, E., Calvert, D., 1971. Embryosystematics in the aphidiines (Hymenoptera: Braconidae). *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri di Portici*. 29, 223-249.

- Tremblay, E., Eady, R.D., 1978, *Lysiphlebus confusus* n. sp. per *Lysiphlebus ambiguus* sensu Auct. nec Haliday (1834) (Hymenoptera, Ichneumonoidea). *Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri, Portici*. 180-184.
- Tremblay, E., Pennacchio, F., 1988. Speciation in Aphidiine Hymenoptera (Hymenoptera: Aphidiidae). *Advances in Parasitic Hymenoptera Research*. Leiden, The Netherlands, EJ Brill, 139-146.
- Vinson, S.B., 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annual review of entomology*. 21, 109-133.
- Vinson, S.B., 1984. Parasitoid-host relationship, In: Bell, W.J.a.C., R.T. (Ed.) *Chemical ecology of insects*. Chapman and Hall., London, pp. 205-233.
- Völkl, W., 1992. Aphids or their parasitoids: who actually benefits from ant-attendance? *Journal of Animal Ecology*. 61, 273-281.
- Völkl, W., Mackauer, M., 1996. "Sacking" the host: Oviposition behavior 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.
- Vukasović, P., 1928. Prilog poznavanju entomofagnih insekata parazita. *Glas srpske kraljevske akademije*. 131, 45-72.
- Wahl, D.B., Sharkey, M.J., 1993. Superfamily Ichneumonoidea, In: H. Goulet and J. T. Huber, E. (Ed.) *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Agriculture Canada, Ottawa, pp. 358-509.
- Way, M., Van Emden, H., 2000. Integrated pest management in practice-pathways towards successful application. *Crop Protection*. 19, 81-103.
- Weseloh, R.M., 1981. Host location by parasitoids. In: *Semiochemicals: Their Role in Pest Control*. John Wiley & Sons, New York, 79-95 pp.

- Wharton, R., Shaw, S., Sharkey, M., Wahl, D., Woolley, J., Whitfield, J., Marsh, P., Johnson, W., 1992. Phylogeny of the subfamilies of the family Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea): a reassessment. *Cladistics*. 8, 199-235.
- Wharton, R.A., Marsh, P.M., Sharkey, M.J., 1997. Manual of the New World genera of the family Braconidae (Hymenoptera). The International Society of Hymenopterists Washington, DC.
- Wheeler, Q.D., Raven, P.H., Wilson, E.O., 2004. Taxonomy: impediment or expedient? *Science* (New York, NY) 303, 285.
- Whitfield, J.B., 1992. The polyphyletic origin of endoparasitism in the cyclostome lineages of Braconidae (Hymenoptera). *Systematic Entomology*. 17, 273-286.
- Whitfield, J.B., Mardulyn, P., Austin, A.D., Dowton, M., 2002. Phylogenetic relationships among microgastrine braconid wasp genera based on data from the 16S, COI and 28S genes and morphology. *Systematic Entomology*. 27, 337-359.
- Wickremasinghe, M., 2012. Searching behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius rhopalosiphi* (Hymenoptera: Aphidiidae) in response to honeydew excreted by aphids on different host plants. *Ruhuna Journal of Science*. 2.
- Wickremasinghe, M., Emden, H.V., 1992. Reactions of adult female parasitoids, particularly *Aphidius rhopalosiphi*, to volatile chemical cues from the host plants of their aphid prey. *Physiological Entomology*. 17, 297-304.
- Will, K.W., Rubinoff, D., 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*. 20, 47-55.
- Xue-Xin, C., Mei-Hua, P., Whitfield, J., Jun-Hua, H., 2003. A molecular phylogeny of the subfamily Rogadinae (Hymenoptera: Braconidae) based on the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Acta Entomologica Sinica*. 46, 209-217.
- Yu, D., van Achterberg, C., Horstmann, K. 2012. Taxapad 2012: World Ichneumonoidea, Taxonomy, biology, morphology and distribution. Vancouver, Canada.

- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D., 2012. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Academic Press.
- Žikić, V., 1999. Faunistička i biogeografska studija brakonida Sićevačke klisure (Braconidae: Hymenoptera). Univezitet u Beogradu, Beograd.
- Žikić, V., Achterberg, C.v., Stanković, S., 2010. A contribution to Braconidae, Hybrizontidae (Ichneumonoidea: Hymenoptera) and Stephanidae (Stephanoidea: Hymenoptera) from the south-West Balkans. *Acta entomologica serbica*. 15, 227-235.
- Žikić, V., Brajković, M., Tomanović, Ž., 2000. Preliminary results of braconid fauna research (Hymenoptera: Braconidae) found in Sićevo Gorge, Serbia. *Acta entomologica serbica*. 5, 95-110.
- Žikić, V., Ilić-Milošević, M., Stanković, S., Petrović, A., Petrović-Obradović, O., Kavallieratos, N., Starý, P., Tomanović, Ž., 2012a. Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) of Serbia and Montenegro: Tritrophic interactions. *Acta entomologica serbica*. 17, 83-105.
- Žikić, V., Stanković, S.S., Ilić, M., 2012b. Checklist of the genus *Bracon* (Hymenoptera: Braconidae) in Serbia. *Biologica Nyssana*. 3, 21-29.
- Žikić, V., Stanković, S.S., Ilić, M., Kavallieratos, N.G., 2012c, Braconid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) on poplars and aspen (*Populus* spp.) in Serbia and Montenegro. *North-Western Journal of Zoology* 9, 264-275.
- Žikić, V., Tomanović, Ž., Ivanović, A., Kavallieratos, N.G., Starý, P., Stanisavljević, L.Z., Rakhshani, E., 2009. Morphological characterization of *Ephedrus persicae* biotypes (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in the Palaearctic. *Annals of the Entomological Society of America*. 102, 1-11.

BIOGRAFIJA AUTORA

Kandidat Saša S. Stanković je rođen 02.05.1982. godine u Leskovcu. Osnovnu školu i Gimnaziju je završio u Lebanu, a zatim, 2001. godine upisuje Prirodno matematički fakultet Univerziteta u Nišu, gde je i studirao na Departmanu za biologiju i ekologiju. Diplomirao je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,04, a diplomski rad pod nazivom: „Odlike makrozoobentosa Šumanske reke“ je odbranio 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, a takođe i u međunarodnim naučnim projektima SCOPES i FP7 (BIOCOMES).

U periodu 2010-2012 radi kao istraživač pripravnik na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Nišu, a zatim se zapošljava na mesto asistenta za užu naučnu oblast Zoologija u navedenoj instituciji.

Član je Entomološkog društva Srbije i Biološkog društva „dr Sava Petrović“.

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

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани _____ Саша С. Станковић _____

број индекса _____ Б3103 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Филогенетски односи родова субтрибуса *Lysiphlebina* и таксономски статус
врста рода *Adialytus* (Foerster) (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)**

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ **29.12.2014.** _____



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Саша С. Станковић _____

Број индекса _____ Б3103 _____

Студијски програм _____ Морфологија, систематика и филогенија животиња

Наслов рада _____ **Филогенетски односи родова субтрибуса *Lysiphlebina* и
таксономски статус врста рода *Adialytus* (Foerster)
(Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)**

Ментор _____ др Владимир Жикић и др Анђелко Петровић _____

Потписани/а _____ Саша С. Станковић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао 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, _____ **29.12.2014.** _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Филогенетски односи родова субтрибуса *Lysiphebia* и таксономски статус врста рода *Adialytus* (Foerster) (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae)

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 29.12.2014.



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

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

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

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

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

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