

1. Bevezetés

A biológiai organizáció különböző szintjein tapasztalható sokféleség megőrzése a konzerváció-biológia egyik fő célkitűzése, különös tekintettel a természetes habitatok beszűkülésére és fragmentálódására. Az élőhelyek feldarabolódása a populációk tagolódását és a szubpopulációk izolációját okozza. Az izoláció meghatározóan hat a populációk genetikai struktúrájára, nevezetesen csökkenti az effektív populációméretet és a genetikai variabilitást. Az alacsony genetikai variabilitás beszűkíti az adott populációk evolúciós potenciálját. A habitat fragmentáció és az izoláció tehát végső soron csökkenti a populációk túlélésének esélyeit. Bár a különböző fajok eltérően reagálnak a habitat fragmentálódására, a populációk genetikai szerkezetének tanulmányozása fontos információt nyújthat egy adott faj természetvédelmi állapotáról. A legtöbb rovarfaj esetében az enzimpolimorfizmus vizsgálata alkalmasnak bizonyult a genetikai variabilitás monitorozására.

Az *Isophya* genusnak több mint 45 faja van Európában. Ebben a régióban a fajok azonosítása szempontjából a legproblematisabb Tettigonioidea csoport. Az “isos” görög eredetű szó, egyenlőt, hasonlót jelent, míg a “phyo” jelentése nemz. Az *Isophya* név arra utal, hogy a genusba tartozó fajokat nehéz elkülöníteni egymástól, magyarra talán az “egyívású” szóval fordíthatnánk. Az *Isophya* fajok a cercus görbülete, a pronotum, a szárnyak és a tojócső sokszor árnyalatnyi különbsége alapján különíthetők el morfológiailag, legbiztosabban énekük alapján azonosíthatók. Magyarországon hat *Isophya* faj fordul elő: a fokozottan védett *I. costata* (magyar tarsza) és *I. stysi* (Stys tarszája); a védett *I. camptoxypha* (kárpáti tarsza), *I. modesta* (pusztai tarsza), *I. modestior* (illír tarsza); valamint az *I. kraussi* (erdei tarsza), mely nem védett. Az *Isophya* fajok rövid szárnyúak, röpképtelenek, emiatt gyenge a kolonizációs képességük. Talajba petéznek,

tojás alakban telelnek át, lárváik kora tavasszal, általában márciusban kelnek ki. Az imágók májustól augusztusig fordulnak elő. Korai megjelenésük, rejtett életmódjuk, éjszakai aktivitásuk miatt keveset tudunk élőhelyválasztásukról. A tarszákat említő tanulmányok többsége vagy faunisztikai jellegű, vagy egyenesszárnnyú közösségeket írnak le, és a kutatások egymástól térben, időben elkülönülnek. Bár a növényzet típusát a cikkek többsége valamilyen szinten megemlíti, a közölt adatok általában egy adott populációra vonatkoznak. Az *Isophya* fajok habitat preferenciájáról eddig nem készült összehasonlító elemzés, bár a fajok élőhely igényével kapcsolatos többlet információk nagyban hozzájárulnának a természetvédelmi munkák hatékonyságához.

Munkánk fő célkitűzései voltak:

1. A hazai *Isophya* fajok előfordulásával kapcsolatos ismeretek bővítése, különös tekintettel Baranya megyére.
2. Az *Isophya* fajok élőhelyeinek tipizálása, habitat preferencia és indikáció vizsgálata. Koegzisztenciális mintázatok feltárása. Az élőhelyek természetességének megállapítása.
3. Az *Isophya* fajok morfometriai vizsgálata. A morfológiai variabilitás szerkezetének analízise a fajok és a populációk szintjén egyaránt. A fajok, ill. populációk habitat preferenciája és bizonyos, ökológiai szempontból jelentős morfológiai bélyegeik közötti kapcsolat keresése, a habitat preferencia hátterének feltárása.
4. A genetikai variabilitás szerkezetének analízise, a populációk enzimpolimorfizmusának tanulmányozása révén. A fajok közötti genetikai differenciálódás mértékének leírása. A fajokon belüli differenciálódási mintázatok összehasonlítása és elemzése. A genetikai és morfometriai variabilitás struktúrájának összehasonlítása.

2. Módszerek

2.1. Faunisztikai kutatások

A Mecsekben, a Baranyai-dombságban és a Villányi-hegységben végeztük a faunisztikai kutatásokat 1997 és 2003 között. A potenciális *Isophya* élőhelyeket májustól júliusig kerestük fel. A mintavétel fűhálózással, vizuálisan vagy hang alapján való egyedi megkereséssel történt.

2.2. Habitat preferencia vizsgálatok

A habitat preferencia kutatások során a Baranya-megyei négy *Isophya* faj (*I. camptoxypha*, *I. costata*, *I. modesta*, *I. modestior*) élőhelyválasztását vizsgáltuk. Az elemzésekhez 57 (a Mecsekben 30, a Villányi-hegységben 11 és a Baranyai-dombságban 16) terület jelenlét-hiány adatait használtuk fel. Az élőhelyeket egyrészt az Általános Nemzeti Élőhelyosztályozási Rendszer szerinti 14 kategóriába, másrészt 4 mikrohabitat kategóriába (mezofil füves, xerofil füves, mezofil bokros, xerofil bokros) is besoroltuk.

A fajok habitat preferenciájának elemzéséhez főkoordináta analízist (PcoA) végeztünk Czekanowski/Bray-Curtis hasonlósági függvény alkalmazásával, Syn-Tax statisztikai programmal. A hasonlósági függvényhez az adatmátrix a négy faj előfordulási adatait tartalmazta a 14 habitatban. A fajok klasszifikációját élőhely választásuk alapján hierarchikus klaszteranalízissel végeztük. A különböző élőhelyek karakter fajainak meghatározására az IndVal 2.0 programot alkalmaztuk. A fajok előfordulásának véletlenszerűségét a Fisher-féle exakt teszttel, asszociáltságát a Yale-féle χ^2 teszttel vizsgáltuk.

2.3. Morfometria

A morfológiai vizsgálatokhoz mind a hat magyarországi *Isophya* fajt bevontuk. Az állatokat 1998 és 2004 között gyűjtöttük. A molekuláris vizsgálatokig az egyedeket -80°C-on tartottuk, majd a morfometriai vizsgálatokhoz használt testrészeket 75%-os alkoholba helyeztük. 17 populáció 296 hím egyedének 11 morfológiai bélyegét, míg 10 populáció 131 nőstényének 10 jellegét mértük le, 0.01 mm pontossággal. Az adatok elemzéséhez az SPSS 11.0 program diszkriminancia analízis és GLIM menüjét alkalmaztuk. Kruskal Vallis tesztet és Mann-Whitney U-tesztet használtunk a különböző habitatokban élő populációk közti morfológiai bélyeg alapján való elkülönülés vizsgálatához.

2.4. Genetikai vizsgálatok

A genetikai vizsgálatokhoz hat magyarországi tarsza faj 17 populációjából vettünk mintát (204 egyed) hat különböző földrajzi régióból. Az *I. kraussi* két mintáját az Aggteleki karszton és a Zempléni-hegységben gyűjtöttük. A két *I. stysi* minta a Szatmár-Beregi síkságról és a Zempléni-hegységből származik. Az *I. modestior* és az *I. camptoxypha* egy-egy populációjából vettünk mintát a Mecsekben. Az *I. modesta* négy populációja két földrajzi régióból származik: a Mecsekből és a Villányi-hegységből. Az egyedeket 1998 és 2000 között gyűjtöttük.

A tor és a potroh izomzatát egyedenként 4 µl/mg koncentrációjú pufferben (0.01M Tris/HCl pH=7.5; 2 mg/ml dithiotreitol) homogenizáltuk. Az enzimpolimorfizmus vizsgálatát poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. Minden mintában 12 enzimet analizáltunk: Amy, Got, αGpdh, Hk, Idh, Ldh, Me, Pgi, Pgm, Aox, Est 6Pgdh. Mivel fajonként több populációt

is vizsgáltunk, meg tudtuk állapítani a differenciálódás mértékét a fajok között és a fajokon belül.

A gélen látható sávmintázat alapján megállapítottuk az egyedek genotípusát, és kiszámoltuk a genotípus- és az allélgyakoriságokat. Minden egyes populációra kiszámítottuk a genetikai variabilitás mutatóit: polimorf lokuszok aránya, átlagos allélszám, átlagos heterozigóta gyakoriság, többlókuszos genotípusok átlagos száma. A populációk differenciálódásának a megállapításához exakt tesztet végeztünk. A migráló egyedek számát ($N_e m$) az F_{ST} segítségével és Slatkin egyedi allél módszerével is becsültük. A Genepop 1.2 programmal végeztük az exakt tesztet és számoltuk az $N_e m$ értéket. A populációk közti genetikai differenciálódást a Wright-féle F -statisztikával is elemeztük. Ebben az analízisben a minták teljes genetikai variabilitása (F_{IT}) felosztható a populációk közötti (F_{ST}) és populációkon belüli (F_{IS}) variancia komponensekre. A differenciálódás mértékét jellemző fixációs indexet (F_{ST}) a populációkra és az egyes fajokra külön-külön is meghatároztuk. Az elemzéseket az FSTAT 1.2 programmal végeztük. Az allélgyakoriságok értékeiből kiszámoltuk a Nei-féle genetikai távolságokat. A távolság mátrix alapján UPGMA dendrogrammot szerkesztettünk. A számításokat a Biosys-1, Release 1.7 programmal készítettük. A teljes genetikai variancia megoszlását a hierarchia különböző szintjein molekuláris variancia analízissel (AMOVA) is vizsgáltuk. Az analízis során a teljes genetikai variabilitást három összetevőre bontottuk: populáció csoportok közötti (fajok közötti), az egyes fajokon belüli populációk közötti és populációkon belüli komponensekre. A genetikai variancia analízisét az Arlequin 2.000 programmal végeztük. Az egyedek genotípusos összetétele alapján diszkriminancia analízist végeztünk az SPSS 11.0 programmal.

3. Eredmények és értékelésük

Munkánk során az *Isophya* fajoknak számos új lelőhelyét mutattuk ki Baranya megyében: a Mecsekben minden fajra írtunk le új lelőhelyet; a Baranyai-dombságban először mutattuk ki az *Isophya* fajok előfordulását; a Vülányi-hegységből leírtuk az *I. costata* jelenlétét. Tapasztalataink alapján megállapítottuk, hogy a tarsza fajok nagyobb arányban vannak jelen a vizsgált térségben, mint azt előzetesen feltételeztük. Kimutattuk továbbá, hogy Baranyában messze a leggyakoribb tarsza faj az *I. costata*. Munkánk eredményeként Magyarország ezen régiója lett *Isophya* fajokra a legalaposabban feltárva.

Az élőhely-preferencia vizsgálatok során a Baranyában előforduló négy *Isophya* fajt tanulmányoztuk. Amennyiben az élőhelyeket ÁNÉR kategóriákba soroltuk be, azt tapasztaltuk, hogy az *I. costata* fordult elő a legtöbb típusú (11) habitatban, míg a legkevesebben (5) az *I. camptoxypha* jelent meg. Az *I. modesta* és az *I. modestior* habitat spektruma (7, 9) közepesnek mondható. Egyetlen olyan élőhely-típus volt, amely mind a négy faj számára alkalmasnak bizonyult, ez a mezofil franciaperjés domb- és hegyvidéki rétek kategória volt. Kilenc élőhely-típus két vagy három faj számára is megfelelő volt.

A főkoordináta analízis eredményei azt mutatják, hogy a fajok habitat preferenciája átfedő, ennek ellenére jól jellemezhető. ÁNÉR kategória indikációját nem tudtunk kimutatni, csak kategória-csoportokét. Az élőhelyek mikrohabitat kategóriába sorolása esetén azt az eredményt kaptuk, hogy a füves (elsősorban a mezofil füves) élőhelyek indikátor faja az *I. costata*. Az *I. camptoxypha* a mezofil bokros élőhelyek, az *I. modestior* pedig a xerofil bokros élőhelyek indikátora. Az *I. modesta* egyik élőhelyet sem preferálja kiemelten. Megállapítottuk továbbá, hogy a xerofil füves területeket egyik faj sem jelzi. A vizsgálataink során tapasztalt *Isophya* fa-

jok habitat szegregációja valószínű a nőtények tojócsövének mikrohabitatokhoz való adaptációját és a fajok egymáshoz való viszonyát tükrözi.

A talajba petéző fajoknál a tojásrakás mélységének optimalizációját befolyásoló két legfontosabb tényező a talaj nedvességtartalma és szerkezete. Túl nedves és kötött talajban a mélyen fekvő petékből kikelő lárváknak magas a mortalitási aránya. Laza szerkezetű és száraz talajban viszont kevésbé vannak védve a peték a kiszáradás, az erózió és a predátorok ellen.

A tarszák, feltehetően más talajba petéző Orthoptera csoportokhoz hasonlóan, szabályozni tudják a peterakás mélységét. Így az *I. costata* és *I. modesta* viszonylag hosszabb tojócsöve lehetővé teszi, hogy száraz talajban mélyre rakják petéiket, nedves talajban pedig a felszínhez közelebb. A tojásrakásuk optimalizációja teszi lehetővé, hogy ezek a fajok szélesebb spektrumú habitatokban fordulhatnak elő, mint a rövidebb tojócsövű fajok. Hipotézisünket alátámasztja az a tény is, hogy a leghosszabb tojócsövű *I. modesta* és a szintén hosszú tojócsövű *I. costata* a nedves réteken és a legszárazabb területeken is előfordultak. Mindkét faj esetében a szárazabb területeken élő populációk tojócsöve hosszabb volt. Bár az *I. modesta* tojócsöve átlagosan hosszabb, mint az *I. costata* fajé, a két faj populációi között átfedés mutatkozott. A szárazabb habitatban élő *I. costata* egyedek tojócsöve hosszabb volt, mint a kevésbé száraz habitatban élő *I. modesta* példányoké. Nem szabad figyelmen kívül hagynunk azt a tényt sem, hogy rövid tojócsövű fajokat kifejezetten száraz területen nem találtunk.

A tarsza fajok gyakrabban fordultak elő együtt adott lelőhelyen, mint azt az irodalmi adatok alapján vártuk volna. A hosszabb tojócsövű *I. costata* és *I. modesta* egyedek csak egy alkalommal találtuk meg ugyanazon a lelőhelyen, míg a két másik, rövidebb tojócsövű faj valamelyikével viszonylag gyakran voltak együtt. Ugyanez igaz a rövidebb tojócsövű *I. camptoxypha* és *I. modestior* fajokra is, csak egy helyen találtuk meg őket

közösen. Valószínűsíthető, hogy a körülbelül azonos tojócső hosszúságú fajok egymással szemben versenytársat jelentenek, így feltételezzük, hogy a fajok koegzisztenciális mintázata a kompetitív kizárás elvére vezethető vissza.

Az *I. camptoxypha* csak természetes, ill. természetközeli élőhelyeken fordult elő, az *I. modesta* és az *I. modestior* kis mértékben megjelent a másodlagos élőhelyeken is, míg az *I. costata* populációk nagy részét többé-kevésbé degradált, másodlagos élőhelyen találtuk meg. Az *Isophya* fajok fennmaradása érdekében kitüntetett figyelmet kéne azokra a területekre fordítani, ahol egyszerre két vagy három faj fordul elő.

A morfometriai analízisekbe mind a hat hazai *Isophya* fajt bevontuk. A vizsgált karakterek leíró statisztikája alapján megállapítottuk, hogy a legtöbb jelleg kapcsán nagy a fajok közötti átfedés. A nőstényeknél egyedül az *I. kraussi* különíthető el statisztikailag a többi fajtól öt jelleg alapján. A hímek között azonban három faj egyedei alkotnak diszkrét csoportot statisztikailag különböző jellegek alapján. A vizsgálat eredményeként adódó, elkülönítő jellegek taxonómiai használhatósága azonban megkérdőjelezhető az egyes jellegek közötti minimális különbségek miatt.

Annak ellenére, hogy kevés diagnosztikus jelleget találtunk, az adatok sokváltozós elemzése azt mutatta, hogy a hat faj jól elkülönül egymástól mind a két nem esetében. A diszkriminancia analízisben az egyedek fajokba sorolásának a sikere 99.3% volt hímeknél a szárnyak mérete és alakja alapján, illetve 97.6% volt a nőstények esetében, ahol a tojócső és a femur hosszúsága volt az osztályozás alapja.

A fajok differenciálódásának mértékét az egyes morfológiai jellegek átlagos értékeiből számított Euklédesszi távolságok alapján szerkesztett fenogramok segítségével is tanulmányoztuk. A hímekre és a nőstényekre szerkesztett fenogramok között az egyik alapvető hasonlóság a *costata-modesta* és a *camptoxypha-kraussi-modestior-stysi* fajcsoportok elkülönü-

lése. A második hasonlóság, hogy ez utóbbi csoporton belül mindkét nemnél külön ágba került az *I. kraussi*. Harmadikként említjük meg az *I. modestior* és *I. stysi* fajok együttes megjelenését. Ugyanakkor jelentős különbség van a két fenogram között a fajcsoportokon belüli differenciálódás mértékében. A hímeknél az *I. costata* és az *I. modesta* között sokkal magasabb szintű volt a differenciálódás, mint a nőstényeknél. Ez a mintázat azt sugallta, hogy a *costata* nőstények esetében a lokális adaptáció jelentősebb különbséget eredményezett a populációk között, így csökkent a fajok közti diszkontinuitás.

A diszkriminancia analízis eredményei alátámasztották feltételezésünket. Hímeknél az *I. costata* és *I. modesta* egyedek 100%-át sorolta a megfelelő fajba a program, míg nőstényeknél kölcsönös átfedést tapasztaltunk a két faj között. Ezzel szemben populációs szinten a *costata* hímeknél az összesített találati arány 60% volt, míg a nőstényeknél az egyedek 75%-át sorolta a megfelelő populációba a program. Vizsgálatunkban a lokális adaptációt feltehetően a tojócső hossza és a habitat preferencia közötti fentebb leírt összefüggést tükrözi. Bár az *I. modesta* tojócsöve átlagosan hosszabb, mint az *I. costata* fajé, az egyes populációk között átfedés mutatkozik; a szárazabb habitatban élő *costata* egyedek tojócsöve hosszabb, mint a nedvesebb habitatban élő *modesta* példányoké.

Az ivari dimorfizmus vizsgálatoknál a nemek testméretre utaló bélyegei alapján végeztük el a diszkriminancia analízist. A nőstények szignifikánsan nagyobbak mind a hat tarsza fajnál. A nőstények valószínűleg nagyobb testméretük következtében több energiát tudnak fektetni az utódokba, ezáltal növelve fitnesszüket, így a nagyobb méret evolúciós előnnyel járhat.

A hierarchikus variancia analízis eredményei a fajok közötti magas szintű differenciálódást mutatta ki. Mind a hímeknél, mind pedig a nőstényeknél a teljes morfológiai varianciának átlagosan a háromnegyede volt

megfigyelhető a fajok között. A diszkriminancia analízishez hasonlóan a hímeknél a szárnyakon mért bélyegek, míg a nőstényeknél a femur- és a tojócső hossza voltak a diszkrimináló jellegek.

A genetikai variabilitás vizsgálata során kimutattuk, hogy a hazai *Isophya* fajok polimorfizmusa kissé magasabb szintű, mint amit más Orthopterákra eddig leírtak. A genetikai differenciálódás mértéke meglehetősen magas volt a fajok között. Három diagnosztikus lókuszt találtunk, amelyek alkalmasak voltak az egyedek fajokba történő besorolására. Az *Isophya* populációk között magas szintű differenciálódást tapasztaltunk, ami magas populáción belüli differenciálódással párosult.

A Nei-féle genetikai távolságok alapján szerkesztett dendrogram, a fenogramokhoz hasonlóan, világosan tükrözi a hat faj elkülönülését. Ugyanakkor a dendrogram topológiája eltér a fenogramokétól. Ezt minde- nek előtt az *I. modestior* és az *I. stysi* egymáshoz viszonyított helyzete tükrözi. A fenogramokon a két faj egy ágban jelenik meg, míg dendrogramon az *I. modestior* a többi fajtól távol, külön ágban helyezkedik el. Ugyanakkor a fenogramok és a dendrogram hasonlóságát mutatja az *I. modesta* és az *I. costata* egymáshoz viszonyított helyzete. Meg kell azonban jegyezni, hogy a fenogramok és a dendrogram hasonlósága azoknak a fajoknak a le- származási kapcsolataiban jelentkezett, amelyeknek több populációjából történt a mintavétel. Óvatosságra int, hogy az eltérések viszont azoknál a fajoknál mutatkoztak, amelyekből egyetlen, kis példányszámú minta szár- mazott.

Az allélmintázatok alapján a populációkat Euklédesszi távolsággal és Ward-Orlóci fúziós módszerrel is osztályoztuk. Az így kapott dendrogramon, bár az *I. costata* külön ágba került, ebben az esetben is az *I. modesta* faj állt hozzá a legközelebb. Hasonlóan a fenogramokhoz az *I. stysi* populációihoz az *I. modestior* áll legközelebb.

A genetikai variancia hierarchikus analízisének eredménye összecsengett a morfológiai jellegek elemzésénél tapasztaltakkal. A teljes genetikai variancia legnagyobb hányada mindkét analízisben a fajok között mutatkozott. A diagnosztikus lókuszok esetében gyakorlatilag teljes differenciálódást tapasztaltunk a populációk között. A differenciálódás mintázatát a fajokon belül, a lokális populációk között elsősorban az *I. costata* és az *I. modesta* esetében tudtuk vizsgálni. Magas szintű differenciálódást tapasztaltunk nyilvánvaló földrajzi mintázat nélkül, amit a korlátozott migrációval magyaráztunk. Feltételezésünket az *I. modesta* és az *I. costata* populációk differenciálódási mintázatának összehasonlítása támasztotta alá. Míg a szélesebb habitat spektrummal jellemezhető *costata* populációk esetében a génáramlás becsült értéke ($N_e m$) relatíve magas volt, valamint a diszkriminancia analízisben a populációkba sorolás találati aránya alacsony szintű volt, addig az izoláltabb populációkban élő *modesta*-nál az $N_e m$ érték alacsonynak adódott, ugyanakkor a populációkba sorolás sikeressége magas volt.

Kutatásunk során megállapítottuk, hogy a vizsgált *Isophya* fajok előfordulási gyakorisága, habitat-preferenciája, élőhely-választási spektruma, élőhelyének természetessége, morfometriája, valamint genetikai variabilitása között szoros összefüggés van.

1. Introduction

Survival of natural populations in fragmented landscapes is one of the central problems in conservation biology. Habitat fragmentation results in isolation and population subdivision. Consequently, it has grave influence on the genetic structure of populations resulting in decreasing effective population size and loss of genetic. The level and structure of genetic variation will in turn determine the evolutionary potential of the given set of populations. Nevertheless, different species may experience the same fragmented habitat in a different way. Thus, surveys of genetic differentiation among local populations within a species or between closely related species became more and more established in conservation studies. Monitoring allozyme polymorphism proved to be appropriate to estimate the level of polymorphism and the structure of genetic variation in the populations of many species.

The genus *Isophya* (Orthoptera) has more than 45 species in Europe. In this region this Tettigonidae species are the most difficult to identify. The greek term “isos” means equal, similar and “phyo” means to beget, to father. So the name *Isophya* (Brunner von Wattenwyl 1878) refer that the bush cricket species in this genera are very similar. The identification of *Isophya* species are based mainly on subtle differences in the shape of cerci, pronotum, tegmina and ovipositor by their morphology. Species can be identified most certainly by the songs of males. There are six *Isophya* species in Hungary. *I. camptoxypha*, *I. modesta* and *I. modestior* are protected, *I. costata* and *I. stysi* are under special protection. *I. kraussi* is not protected. Species of the genus *Isophya* are phytophagous and flightless so they have weak colonisation ability. These bush crickets insert their eggs into the soil and they overwinter as eggs. Their common characteristic is that, depending on weather and climate, their larvae emerge relatively

early, generally during March in Hungary. Adult specimens can be found from May to August. Due to their early emergence, hidden way of life and nocturnal activity little has been known about the habitat requirements of the species. Most of the studies carried out on them are of a faunistic character, or describe orthopteran; the investigations have been performed separately from each other both in space and in time. Although habitat types have been dealt with at certain levels (association, habitat, food plant) in these studies, the data were always collected from single populations. No comprehensive analysis has yet been produced on the habitat choice of *Isophya* spp. and future conservation work would greatly benefit from an increased knowledge on species habitat demands.

The main objects of the research were:

1. Expand our knowledge in connection with the occurrence of *Isophya* species with special regard to Baranya county.
2. Specify the habitats and examine the habitat preference and indication of the *Isophya* species. Explore the patterns of coexistence. Establishment the naturalness of habitats.
3. Morphometric study of hungarian *Isophya* species. Analyse the structure of morphometric variation on the level of both species and populations. Find relationship between the habitat preference of the species and certain ecological important morphometric characters. Explore the background of habitat preference.
4. Analyse the structure of genetic variation with monitoring allozyme polymorphism of populations. Determine the the level of genetic differentiation among the species. Analyse and compare the pattern of differentiation within the species. Compare the structure of the genetic and morphometric variation.

2. Methods

2.1. Faunistical researches

In the faunistical investigations occurred between 1997 and 2003 four species took part in Baranya county, South Hungary. The sampling was carried out from May to July examining numerous potential habitats using sweeping-nets, by visual or acoustic detection.

2.2. Habitat preference

Four *Isophya* species took part in the habitat preference researches occurring in Baranya county: *I. camptoxypha*, *I. costata*, *I. modesta* and *I. modestior*. Presence/absence data of 57 sites (in Mecsek Mts. 30, in Villány Hills 11 and in Baranya Hills 16 sites) were used in the analysis. Habitats of the various species were categorised on the one hand into 14 classes according to the Hungarian General Habitat Classification System (HGHCS) and on the other into 4 microhabitat categories (mesophil and, xerophil grassy, mesophil bushy and xerophil bushy habitats).

For the habitat preference analysis of the species a multiple Principal Coordinate Analysis (PCoA) were used, using the Syn-Tax statistical program. For the similarity function the data matrix contained the numbers of the four species in the 14 habitat groups. A hierarchical cluster-analysis was performed for the classification of the species by their habitat preference. We used the IndVal 2.0 program to reveal indication. The Fisher's exact test and the Yale's χ^2 test were performed in the association studies.

2.3. Morphometrics

In the morphometric studies all of the six hungarian *Isophya* species were included. Imagines were collected between 1998 and 2004. The specimens were stored at -80 °C until the genetic examination and then we deposited the required part of the body into 75% alcohol for morphometric measuring. 296 male specimens of 17 populatons for 11 characters and 131 female specimens of 10 populations for 10 characters were measured to the 0.01 mm. The SPSS program was applied for the univariate-, hierarchical cluster- and discriminant analysis. The Kruskal Vallis test and Mann-Whitney U-test were also performed to examine the difference between the populations.

2.4. Genetics

17 populations were sampled for the six species from six distinct geographical regions in Hungary. Two *I. kraussi* samples were collected in Aggtelek Karst and one in Zemplén Mts. The two *I. stysi* samples originated from Bereg lowland and from Zemplén Mts. One sample of *I. modestior* single and *I. camptoxypha* were collected in Mecsek Mts. Four populations of *I. modesta* were sampled in two regions: in the Mecsek Mts. and in the Villányi Hills. The six samples of *I. costata* originated from three regions: from the Mecsek Mts., the Baranya Hills and the Villányi Hills.

Imagines were collected in 1998-2000 and stored at -80 °C until the electrophoresis. Muscles dissected from the thorax and abdomen of the specimens were homogenised separately in approx. 4 µl/mg of the extraction buffer (0.01M Tris/HCl pH=7.5; 2 mg/ml dithiotreitol). Enzyme polymorphism was investigated by polyacrylamide gel electrophoresis. 12 en-

zymes were studied in all samples: Amy, Got, α Gpdh, Hk, Idh, Ldh, Me, Pgi, Pgm, Aox, Est 6Pgdh.. In this way, we could determine the level of differentiation both within the species and between them.

Genotype and allele frequencies were calculated on the basis of banding patterns. Measures of genetic variation (average number of alleles, proportion of polymorphic loci, average frequency of heterozygotes and average number of multi-locus genotypes) were calculated for each population. An exact test for population differentiation was conducted to test for independence of the allelic composition of the populations. The effective number of migrants ($N_e m$) was also estimated according to Slatkin. GenePop, version 1.2 was used to perform the exact test and calculate $N_e m$ values. Genetic differentiation among the populations was also analysed by Wright's F-statistics. In this analysis, the total genetic variation of the samples (F_{IT}) is partitioned into within (F_{IS}) and between population components (F_{ST}). F-statistics was computed within each species as well. All analyses were conducted by FSTAT version 1.2. Allele frequencies were used to estimate Nei's genetic distances and an UPGMA dendrogram was constructed on the basis of these data. The computation was performed by Biosys-1, Release 1.7. The distribution of the total genetic variation at various levels of the hierarchy was studied by AMOVA. In this analysis, the total genetic variation is partitioned into three components: among groups of populations (species), among populations within a species and within population. AMOVA was carried out by Arlequin ver 2.000. In the last part of the study, we carried out a discriminant analysis using the allele frequency distribution of the samples to show the level of genetic differentiation among the species in a reduced space of variables. Discriminant analyses were performed running SPSS Version 11.0.

3. Results and discussion

Many sites of *Isophya* species were reported in Baranya county (Hungary) during our research: new sites were found for all four examined species in the Mecsek Mts., the species were described newly in Baranya-hills, *Isophya costata* was found as a new species for the fauna of Villányi-hills. *Isophya* species were found in larger proportion in the examined region than it had previously been supposed. Moreover we showed that *I. costata* was the most frequent *Isophya* species in Baranya County. As a result of our work this region turned out to be the most thoroughly discovered area of Hungary for *Isophya* species.

In the study of habitat preference the four *Isophya* species occurring in Baranya County were analyzed. It was found that *I. costata* occurred in the broadest range of habitat types and *I. camptoxypha* in the least one when habitats were sorted into classes of the Hungarian General Habitat Classification System (HGHCS). *I. modesta* and *I. modestior* had middle size habitat range. The only habitat type suitable for all four species was the false oat-grass meadow. Nine habitat types were suitable for either two or three bush cricket species. The results of principal coordinate analysis indicated an overlapping habitat choice of the 4 species, though each of them exhibited special attraction to certain habitat types.

We could not prove any indication concerning particular HGHCS categories only groups of habitats. When the habitats were classified into different microhabitats, we found that *I. costata* indicated grassy (primarily mesophil grassy) habitats. While *I. camptoxypha* indicated mesophil bushy habitats *I. modestior* indicated xerophil bushy habitats. *I. modesta* did not show special preference to any of the habitats. Furthermore, we pointed out that none of the species indicated xerophil grassy habitats. In the course of our survey we revealed that the habitat segregation of *Isophya* species

probably reflected the adaptation of ovipositor for particular microhabitats and the relationship among the species.

In case of species ovipositing in soil the optimisation of the depth of oviposition primarily depends on the moist and the structure of the soil. Hatchling juveniles have high mortality in too damp and hard soil if eggs are inserted too deep. Offspring survival is a function of depth as nymphs that hatch too deep are not able to dig out of the soil and die before reaching the surface. Eggs laid too shallow have high risk of being desiccated, frozen, or preyed upon.

We supposed that *Isophya* species similarly to other Orthopterans could regulate the depths of oviposition. That's why *I. costata* and *I. modesta* with relatively longer ovipositor can lay their eggs deep in dry soil or less deep in moist soil. The optimisation of oviposition allows this species to occur in a broadest range of habitat types than others with shorter ovipositor. Our hypothesis was supported by the fact that *I. modesta* with the longest average ovipositor and *I. costata*, which has also long ovipositor, occurred in moist meadows and in the driest habitats as well. Both species had longer ovipositor in drier habitats than in less dry. Although *I. modesta* had longer average ovipositor than *I. costata* there was an overlap between the two species. Moreover, *I. costata* specimens had longer ovipositor in an extremely dry habitat than *I. modesta* living in less dry habitats. In addition, species with short ovipositor was not found in dry habitats.

Isophya species coexisted more frequently at a given site than it was expected on the basis of the literature. *I. costata* and *I. modesta* the two species with longer ovipositor were only found together once, while they often co-occurred with any of the other two species with shorter ovipositor. The same is true for *I. camptoxypha* and *I. modestior*, which have shorter ovipositor. We only found them once at the same site. Species having

approximately the same length of ovipositor are probably rivals so we suppose that the pattern of species co-occurrence can be explained by the principle of competition.

While *I. camptoxypha* only occurred in natural and semi natural habitats, *I. modesta* and *I. modestior* were also found in secondary habitats. Most of the *I. costata* populations lived in more or less degraded secondary habitats. In order to preserve endangered species it might be important to save a wide range of habitats with different local climates. This is particularly valid for *Isophya* species as they are distributed over a wide range of habitats and they often co-occur in many of them.

All six Hungarian *Isophya* species were included in the morphometric analyses. We found that most individual characters were largely overlapping among the species. Among the females, *I. kraussi* was the only species, which had five diagnostic characters and could be separated undoubtedly from the other species. In case of males, however, three statistically discrete groups were detected based on different characters. Nevertheless, the diagnostic value of these characters is dubious as the size of difference among the species was usually very small.

Although we only found a few diagnostic characters the results of multivariate analyses indicated clear differentiation among the six species in both sex. In the discriminant analysis, 99.3% of the males were assigned correctly on the basis of the size and shape of wings and 97.6% of the females based on the length of the ovipositor and hind legs.

The level and pattern of differentiation among the species was also investigated by phenograms, which were constructed for the males and females separately using Euclidean distances calculated between the mean values of single characters. We detected some principal similarities between the phenograms of the two sexes. First, the main split among the species was between the *costata-modesta* and *camptoxypha-kraussi*-

modestior-stysi groups. Second, *I. kraussi* was clearly separated within the latter group. Third, *I. modestior* and *I. stysi* were classified as closest neighbours in both phenograms. At the same time there was an evident difference between the two phenograms in the level of differentiation within the two species-groups. The degree of differentiation between *I. costata* and *I. modesta* was higher in males than in females. This pattern suggested that in females local adaptation resulted in remarkable differences among populations and consequently decreased discontinuity between the species. The results of discriminant analysis confirmed our assumption.

The program assigned 100% of the *I. costata* and *I. modesta* males correctly, while in females there was a mutual overlap between the populations. On the contrary, the success of prediction was 60% and 75% for the *costata* males and females, respectively at the population level. It thus appears that local adaptation (i. e. the differentiation among the populations) is more expressed in females than in males. This suggests that the background of local adaptation might be the relationship between ovipositor length and habitat preference. Although the average ovipositor size was longer in *I. modesta* than in *I. costata* there was an overlap between the two species. Namely, *I. costata* had longer average ovipositor length in drier habitat than *I. modesta* had in less dry habitats.

When sex dimorphism was investigated discriminant analysis was performed using single characters, which were associated with body size. Females were significantly larger in all six species. This implies that females can invest more energy into the next generation due to their greater body size increasing their fitness in this way. Thus larger size may ensure evolutionary advantage.

The results of hierarchical analyses showed a high degree of differentiation among the species. Both in males and females

approximately 75% of the total variance was explained by the differences among the species. As in the discriminant analysis the differentiating characters were the size and shape of wings in males and the length of ovipositor and hind legs in females.

We observed a comparatively high level of polymorphism in the six *Isophya* species at the investigated enzyme loci. This level was slightly higher than that described in other Orthoptera species. The amount of genetic differentiation was also sizable among the species. We found three diagnostic loci, which had markedly different the allele composition in the six species. It thus appears that the high level of genetic differentiation among the investigated *Isophya* populations was coupled with a sizeable amount of variation within them.

Similarly to the phenograms the dendrogram constructed on the basis of Nei's genetic distances reflected clear separation among the six species. At the same time, the topology of the dendrogram differed from that of the phenograms, which was mostly expressed in the position of *I. modestior* and *I. stysi* relative to each other. In the phenograms, the two species were clustered together in the same branch. On the contrary, *I. modestior* was separated from the other species in the dendrogram. Nevertheless, the phenograms and the dendrogram were similar concerning the position of *I. costata* and *I. modesta*. It is important to note, that the similarities between the phenograms and the dendrogram were mainly expressed in those cases where we had more population samples of the species. In contrast, the differences were most obvious in those species of which we only had one or two small samples.

Classification was also computed using Euclidean distances calculated on the basis of the allele composition of the populations and the Ward-Orloczi method of clustering. This procedure resulted in a

dendrogram where the position of *I. stysi* and *I. modestior* was similar to that of the phenograms.

The results of the hierarchical analyses of genetic variance were in agreement with those of the morphometric analyses. The highest portion of variation was observed among the species in both analyses. At the diagnostic loci, we detected almost complete differentiation among the populations. The within species pattern of differentiation was mostly observed in *I. costata* and *I. modesta*. We found a high level of differentiation without an evident geographic pattern. A possible explanation of this finding might be restricted gene flow among the populations. The comparison of the pattern of differentiation between *I. costata* and *I. modesta* supported our assumption. The effective number of migrants (N_{em}) was relatively high among the populations of *I. costata*, which occupied a fairly wide range of habitats. In the discriminant analysis, the success of classification was also rather low in this species. As opposed to *I. costata*, the estimated number of migrants was low but the success of classification was high among the populations of *I. modesta*, which only occurred in a few isolated habitats.

In the course of our study, we found a strong association among the occurrence, habitat preference, range of habitat choice and the structure of morphometric as well as genetic variation in the Hungarian *Isophya* species.

Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Szakcikk, közlemények:

Referált folyóiratban megjelent:

- Pecsenye K., **Vadkerti E.**, Varga Z. (2003): Pattern of generic differentiation in two *Isophya* species (Orthoptera: Tettigonoidae) in north-east Hungary. *Journal of Insect Conservation* 7: 207-213.
- Pecsenye K., **Vadkerti E.**, Varga Z. (2003): Temporal and spatial pattern of genetic differentiation in *Isophya kraussi*. *Acta zool. hung.* 49(3): 167-178. IF: 0.125.
- Purger D., **Vadkerti E.** (2004): A Mecsek és a Baranyai-dombság másodlagos jellegtelen gyepjei, mint tarsza fajok (Orthoptera, *Isophya*) élőhelyei. *Természetvédelmi Közlemények* 11: 255-261.
- Vadkerti E.** (2004): *Isophya* fauna of South-Baranya-Hills (South-Hungary, Transdanubian region. *Somogyi Múzeumok Közleményei* 16: 325-327.
- Vadkerti E.**, Szövényi G. (2005): Habitat preference of protected *Isophya* species (Orthoptera, Phaneropteridae, *Isophya*) occurring in South Hungary. *Biologia, Bratislava* 60(5) in press. IF: 0.183.

Egyéb publikációk:

- Vadkerti E.**, Szövényi G., Purger D. (2003): The *Isophya* fauna of Mecsek and Villány Hills, SW Hungary (Insecta: Orthoptera) - *Folia Comloensis*, Tom. 12: 73-78.

Előadások:

- Pecsenye K., **Vadkerti E.**, Varga Z. (2002): A genetikai differenciálódás mintázata két hazai *Isophya* faj esetében. In: Lengyel Sz., Szentirmai I., Báldi A., Horváth M. Lendvai Á.Z.: *Az I. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia* (Sopron, 2002. november 14-17.) Program és Absztrakt kötete: 178. Magyar Biológiai Társaság, Budapest (poszter).
- Purger D., **Vadkerti E.** (2002): A Mecsek és a Baranyai-dombság másodlagos jellegtelen gyepjei, mint tarsza fajok (Orthoptera, *Isophya*) élőhelyei. In: Lengyel, Sz., Szentirmai, I., Báldi, A., Horváth, M., Lendvai, Á.Z.: *Az I. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia* (Sopron, 2002. november 14-17.) Program és Absztrakt kötete: 178. Magyar Biológiai Társaság, Budapest (poszter).

Az értekezés témakörén kívüli publikációk

Szakcikkek, közlemények

- Farkas S., **Vadkerti E.** (2001): Somogy megye Isopoda faunája (Isopoda: Oniscidea). [The Isopoda fauna of Somogy County (Isopoda: Oniscidea)]. *Nat. Somogy*. 1: 83-85.
- Farkas S., **Vadkerti E.** (2002): First Record of *Armadillidium nasatum* Budde-Lund, 1885 (Isopoda, Oniscidea: Armadillidae) from Hungary. *Acta Phytopatol. Hung.* 37(4): 407-408.
- Vadkerti E.**, Farkas S. (2002): The terrestrial isopod fauna of the Rinya region IV. Szilonic puszta. *Nat. Somogy*. 3: 27-34.
- Farkas S., **Vadkerti E.** (2003): A Látrányi Puszta Természetvédelmi Terület szárazföldi ászkarák (Isopoda: Oniscoidea) faunája. [The terrestrial isopod (Isopoda: Oniscoidea) fauna of the Látrányi Puszta Nature Conservation Area]. *Nat. Somogy*. 5: 77-84.
- Vadkerti E.**, Lajos L. (2004): Contributions to the ground-dwelling spider fauna (Araneae) of Villányi Hills. *Somogyi Múzeumok Közleményei* 16: 301-312.

Előadások:

- Vadkerti E.**, **Farkas S.** (2000): A Dráva-ártér Isopoda faunája IV. Szilonicpuszta. *Folyóvölgyek ökológiai problémái*. 2000. március 23-24. SZAB Székház, Szeged. (előadás).

Ismeretterjesztő irodalom:

- Vadkerti E.** (2003): Amikor a gyilkos szűz simogat. *National Geographic Magyarország* 1(szeptember): 4-6.