

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A TISZAVIRÁG (*PALINGENIA LONGICAUDA*) KÁRPÁT-
MEDENCEI ÁLLOMÁNYAINAK POPULÁCIÓGENETIKAI
KAPCSOLATAI ÉS VESZÉLYEZTETŐ TÉNYEZŐI**

**POPULATION GENETIC RELATIONSHIPS AND THREATS IN
POPULATIONS OF THE LONG-TAILED MAYFLY (*PALINGENIA
LONGICAUDA*) IN THE CARPATHIAN BASIN**

Málnás Kristóf András

Témavezetők

Prof. Dr. Dévai György
egyetemi tanár

Prof. Dr. Lengyel Szabolcs
tudományos tanácsadó



DEBRECENI EGYETEM
Juhász Nagy Pál Doktori Iskola

Bevezetés

Az egykor Európa síkvidéki folyóinak többségében előforduló tiszavirág (*Palingenia longicauda*) állományai XX. században rohamosan fogyatkozni kezdtek, a faj elterjedési területe összehúzódott. Az areacsökkenés eredményeként az 1970-es évektől már csak a Kárpát-medencéből, a Tisza vízrendszeréből, illetve a Rábából ismertek a tiszavirág állományai, valamint a közelmúltban ismét megtalálták populációit az Al-Duna vidékén is (Soldán és mtsai. 2009).

Máig nem tisztázott egyértelműen, hogy pontosan milyen okokkal magyarázható a tiszavirág ilyen mértékű kipusztulása és visszaszorulása. Van hipotézis, amely ezt klimatikus okokkal magyarázza (Haybach 2007), de a leginkább elfogadott vélemény, hogy a faj megirtulásáért elsősorban az ember környezet átalakító tevékenysége tehető felelőssé (Tittizer és mtsai. 2008). Vélhetően mind a két elképzelés szerepet játszhatott abban, hogy végeredményben a tiszavirág elterjedési területe mintegy 95%-kal csökkent a 19. és 20. század során. Az elterjedési terület ilyen arányú elvesztése rendszerint drasztikus csökkenést eredményez a faj genetikai sokféleségében is (Frankham 1996; Campos és mtsai. 2010). A tiszavirág esetében is joggal feltételezhetjük, hogy a Kárpát-medencében fennmaradt populációk genetikai variabilitása meglehetősen alacsony. E hipotézis ellenőrzésére genetikai vizsgálatot végeztünk, amelynek célja a Kárpát-medence területén található populációk genetikai sokféleségnek becslése volt, hogy valami képet kapjunk azok sérülékenységéről.

Habár a tiszavirág a Tisza vízrendszerében sikeresen átvészelte az elmúlt évszázadokat, valamint a recens hazai populációk napjainkban stabilnak tűnnek, az állományok továbbra is ki vannak téve azon klimatikus és antropogén hatásoknak, amelyek feltételezhetően az egykori areacsökkenését okozták. A tiszavirág megmaradt állományainak jelentős része a Tisza vízrendszerén duzzasztókkal vízkormányzott, hidromorfológiai szempontból erősen módosított folyókban található, amelyeken még napjainkban is rendszeresen folynak mederrendezési munkálatok. Bár nagy vonalakban tisztában vagyunk az egyes beruházási típusok tiszavirágra gyakorolt hatásaival, nem állnak rendelkezésünkre mennyiségi becslések ezekkel kapcsolatban, amelyeket egy-egy konkrét beruházás esetén hivatkozási alapot biztosítana az érintett tiszavirág populációk tényleges védelme érdekében.

Végül a már általánosan ismert károsító tényezők mellett a fogvatkozáshoz további, eddig kevésbé megfigyelt és tanulmányozott mechanizmusok is hozzájárulhattak. Munkánk során például a Kisar-Tivadar közötti hídnál megfigyeltük, hogy a híd akadályt jelenthet a folyó felett kompenzációs repülést végző tiszavirág-nőstények számára, mivel azok többsége a hídnál visszafordul, vagy vízkereső viselkedésbe kezd. Hipotézisünk szerint a híd megzavarja vagy meggátolja a nőstények polarotaktikus vízérzékelését, s ezáltal a folyóvízi élőhely fragmentációjához vezethet, melynek többféle populáció-szintű következménye lehet, melyek veszélyeztethetik az érintett populáció hosszú távú fennmaradását. Ezen elképzelés tesztelésére változatos módszerekkel terepi adatokat gyűjtöttünk és laboratóriumi méréseket végeztünk.

Célkitűzések

A disszertációban öt, a tiszavirággal kapcsolatos vizsgálatot mutattam be, melyek három témakörbe sorolhatóak és amelyek célja következő volt.

Az első témakörben elsőként a tiszavirág-lárvák előfordulását és mennyiségét befolyásoló tényezőket vizsgáltam a Felső-Tisza Gergelyugornya és Tarpa közötti szakaszán (18 fkm).

Ennek során tanulmányoztam a tiszavirág-lárvák mennyiségi viszonyait és a tiszavirág-telepek szerkezetét befolyásoló abiotikus változókat a Gulács település melletti Igonya nevű folyókanyarulatban (1. vizsgálat).

A témakör második részében feltérképeztem a tiszavirág telepek elhelyezkedését a szakaszon és kerestük a talált mintázat kialakulásáért felelős tényezőket (2. vizsgálat).

A második témakörben a jelenlegi tiszavirág-állományokat veszélyeztető tényezőket és azok hatásmechanizmusát vizsgáltam.

Elsőként felmértem a tiszavirág élőhelyeinek degradációját okozó partvédő kövezés következtében megfigyelhető állománycsökkenés mértékét Kisar térségében (3. vizsgálat).

A második részben a kisari híd mint lehetséges élőhely-fragmentációt okozó optikai barrier szerepét és annak egyéb, viselkedési és populációs hatásait vizsgáltam részletesebben (4. vizsgálat).

Végül molekuláris genetikai vizsgálatokat végeztünk a megmaradt kárpát-medencei tiszavirág állományokkal kapcsolatban (5. vizsgálat),

amely során célunk volt (i) a genetikai sokféleség felmérése a jelen tiszai és rábai populációkban, (ii) a jelenkori tiszai és rábai valamint a kihalt rajnai populációk összehasonítása és (iii) a rábai populáció eredetének tisztázása.

Anyag és módszer

A dolgozatban részletezett különböző vizsgálatok során a következő mintavételi eljárásokat és elemzéseket alkalmaztuk.

1. vizsgálat: A lárvák mennyiségi mintavételeit a Felső-Tisza Gulács közigazgatási területéhez tartozó Igonya nevű folyókanyar jobb partja mentén báger mintavevő segítségével végeztük. A mintavétel során minden mintavételi egység esetében feljegyeztük a helyben megfigyelt, abiotikus háttérváltozókat (iszaplerakódás, durván partikulált szerves törmelék (CPOM) jelenléte/hiánya, vízáramlás becsült erőssége, vízmélység), illetve feljegyeztük a mintából kimosott tiszavirág lárvák számát és becsült korosztályát. A kapott adatokat többszörös logisztikus regressziós analízissel (jelenlét/hiány adatok) illetve általános lineáris modellekkel (GLM, abundancia adatok) vizsgáltuk.

2. vizsgálat: A tiszavirág-telepek feltérképezését a Felső-Tisza Vásárosnamény és Tarpa (696-714 fkm) közötti szakaszán végeztük az őszi, alacsony vízállású időszakban. A felmérés során, motorcsónakkal a part mentén haladva, a partfalban található járatok alapján nagy pontosságú GPS-szel bemértük az egyes telepszakaszokat, illetve azokat a járatsűrűség alapján „Erős”, „Közepes”, „Gyenge” és „Szórványtelep” kategóriákba soroltuk. A felmérés során gyűjtött adatokat az ArcView 3.2. térinformatikai program segítségével jelenítettük meg és értékeltük.

3. vizsgálat: A kőszórásos partbiztosítás állománynagyságra gyakorolt hatásának vizsgálata során a tiszavirág imágók által hátrahagyott lárvabőröket gyűjtöttük uszadékhálós egy Kisar melletti kövezett és egy Gulács melletti kövezésmentes partszakaszon. Az egyes napok gyűjtési eredményeit páros t-teszt segítségével hasonlítottuk össze.

4. vizsgálat: A Kisar-Tivadar közötti Tisza-híd optikai barrier szerepét polarimetriás képalkotó felvételekkel vizsgáltuk. A polarimetrikus képalkotás részletes leírása Horváth & Varjú (1997) munkájában szerepel. A rajzó nőstények energiatartalmának becslése kaloriméter segítségével történt. A rajzó nőstényeket csónakból fogtuk be, egyrészt közvetlenül a híd tövében feltorlódnó nőstények közül,

másrészt a híd alatt 1 fkm-rel kompenzációs repülést végző nőstények közül. További gyűjtést végeztünk még a rajzás végén, a víz felszínén sodródó kimerült példányok közül. A befogott példányokat folyékony nitrogénnel hűtött tartályokban, majd a laboratóriumban $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A kalorimetriás mérésekhez Parr 1341 típusú oxigénbombás kalorimétert használtunk. Az adatok elemzése egyutas ANOVA-val és lineáris kevert modellek (GLME) segítségével végeztük.

5. *vizsgálat*: A recens és kipusztult tiszavirág populációk genetikai összehasonlítását mitokondriális DNS szekvenciák (mtCOI, 16S) alapján végeztük. A vizsgálathoz recens populációkból frissen gyűjtött lárvákat, a kipusztult rajnai populációból pedig természetudományi múzeumokban tárolt szárított példányokat használtunk. A DNS-kivonás a lárvák potrohfalából történt a gyártó (friss példányok: DNeasy Blood & Tissue Kit, múzeumi példányok: QIAamp DNA Investigator Kit, mindkettő Qiagen, Hilden, Németország) előírásai alapján. A szelektív DNS felszaporítás során a Jerry és S20 primerek segítségével a mtCOI mintegy 600 bp hosszú szakaszát, valamint a 16Sar és 16SB2 primerek segítségével a 16S riboszómális rRNS mintegy 520 bp hosszú szakaszát sikerült felszaporítani. A múzeumi példányokból a vizsgálathoz újonnan tervezett primerek (PalJS20Int-1F, PalJS20Int-1R) segítségével egy 196 bázispár hosszúságú szakaszt sikerült kinyerni. A szekvenálás ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) segítségével történt. A kapott szekvenciák rendezése, szerkesztése és ellenőrzése a BioEdit program segítségével történt. A haplotípusok közötti leszármazási kapcsolatok megjelenítését a median-joining network ábrázolásával, a Network 4.5.1.6 szoftver használatával végeztük. A DnaSP v. 5 szoftver segítségével számítottuk a szekvenciák haplotípus- és nukleotid-diverzitását. A páronkénti eltérések alapján F_{ST} értékeket számoltunk, majd az Exact Test for Population Differentiation (ETPD) tesztek alapján vizsgáltuk a genetikai elkülönülést az egyes populációk között. A demográfiai változások nyomait Tajima's D és Fu's FS szelektív neutralitás tesztekkel kerestük, míg a Tisza állományainak molekuláris varianciáját AMOVA-val (Analysis of Molecular Variance) elemeztük, majd páronkénti F_{ST} értékeket számítottunk az Arlequin 3.11 programmal. Az effektív populációméret változásait Bayesian skyline plot-tal vizsgáltuk, melyet a BEAST 1.5.4 programmal készítettünk. A tiszai és rábai populációk közötti jelenkori migráció valószínűségét Isolation with Migration (IMa) elemzéssel, míg a múltbeli migrációs scenáriókat a MIGRATE-N v. 3.2.6. szoftverrel elemeztük.

Eredmények

1. vizsgálat: A partfalból 2,5 méteres vízmélységig vett minták alapján megállapítottuk, hogy a tiszavirág-lárvák átlagos egyedsűrűsége nő a vízmélységgel. Megállapítottuk továbbá, hogy a frissen lerakódott, iszapos üledékkel borított telepszakaszokon jóval kisebb számban fordulnak elő lárvák, mint a kötöttebb, agyagos, laza üledék nélküli szakaszokon.

2. vizsgálat: A Felső-Tisza 18 fkm-nyi szakaszának felmérése során a két parton összesen mintegy 3161 m hosszan találtunk tiszavirág járatokat, amiből összesen 2167 m hosszú partszakaszon fordult elő valamelyik minőségi kategóriába sorolható tiszavirág telep, míg a fennmaradó 994 m-en szórványos előfordulást észleltünk. A telepek által benépesített partszakasz 23%-án erős, 38%-án közepes és 39%-án gyenge telep fordult elő. A telepek a folyókanyarok külső ívéén, a sodorvonalhoz közel lévő partszakaszok mentén voltak gyakoribbak és erősebbek.

3. vizsgálat: A természetes és a kőszórással borított partszakaszról gyűjtött levedlett lárvabőrök számának összehasonlítása során a természetes partszakaszról átlagosan 86%-kal több lárvabőr sodródott le, mint a kövezett partszakaszról, mely különbség magasan szignifikáns volt.

4. vizsgálat: A polarimetriás mérések alapján a vizsgált szakaszon a vízfelszínről visszavert fény horizontálisan és közepesen polarizált volt ($30\% < d < 50\%$), mely egyfajta „polarizációs csatornát” alkot a partmenti növényzet által leárnyékol, vertikálisan és csak alacsonyan polarizált ($0\% \leq d < 10\%$) vízfelszínnek között. Mérések alapján a híd betontömege és az általa leárnyékol vízfelület nem polarizált fényt ver vissza ($d \approx 0\%$), mely tehát megbontja a folyásiránnyal szemben kompenzációs repülést végző nőtények által követett polarizációs csatornát. Ennek eredményeképpen a megzavart tájékozódású nőtények megszakítják repülésüket, visszafordulnak, vagy vízkereső viselkedésbe kezdenek, mely idővel a nőtények feltorlódásához vezet a híd folyásirány szerint lefelé elhelyezkedő oldalán. A kalorimetriás mérések alapján a rajzás elején a hídnál gyűjtött nőtények energiatartalma mindössze 68%-a volt az 1 km-rel lentebbről gyűjtött repülő példányokénak és nem különbözött szignifikánsan a rajzás végén gyűjtött, vízfelszínen haldokló példányok energiatartalmától. Ezt a különbséget nem magyarázták sem a száraz testtömegben, a testméret-

változókból vagy a tojással telítettségben levő különbségek. Az uszadékhálós mintavétel kilenc napja során gyűjtött 17 637 levedlett lárvabőr alapján a híd alatti szakaszon a nőstények aránya 67% volt, mely 2:1 nőstény:hím ivararányra felelt meg, míg a híd feletti szakaszon az ivararány nem tért el az 1:1 aránytól.

5. vizsgálat: A frissen gyűjtött példányokból a mtCOI (472 bp) és a 16S (464 bp) szekvenciák összeillesztésével egy 936 bp hosszú szekvencia, míg a múzeumi példányokból egy 196 bázispár hosszú mtCOI gén szekvencia állt rendelkezésre az elemzésekhez. Váratlanul magas genetikai sokféleséget tapasztaltunk mind a Rába, mind pedig a Tisza vízrendszer populációiban. A 245 példányból 87 különböző haplotípust azonosítottunk, amelyek többsége vagy csak a Tisza vízgyűjtőjén (76), vagy csak a Rábán (9) fordult elő, míg két haplotípus mindkét helyen előkerült. A teljes hazai állomány összesített haplotípus-diverzitása (H_d) 0,875, nukleotid diverzitása (π) pedig 0,0031 volt. A haplotípusok többsége közeli rokonságot mutatott egymással és ún. „tripla-csillag” eloszlást alkotott, ami három gyakori- és számos szatellit haplotípusból állt. A gyakori haplotípusok közül kettő csak a Tisza vízrendszeréről került elő, a harmadik viszont mind a Rábában, mind pedig a Tisza vízgyűjtőjén előfordult. A múzeumi példányok mtCOI fragmentumai (196 bp) főleg ugyanazokat a haplotípusokat tartalmazták, mint a frissen gyűjtött példányok. A Tisza és a Rába populációiban jelentős eltérést tapasztaltunk a szelektív neutralitástól (Tajima $D = 1.365$, $p = 0,007$; Fu $F_s = 24.766$, $p < 0.001$), mely a közelmúltban bekövetkezett palacknyak-hatásra utalt. A Bayesian skyline plot viszont az effektív populációméret távoli múltban történt jelentős (2,5 nagyságrendű) növekedését mutatta. A populációk közötti páronkénti összehasonlítások szignifikáns differenciációt mutattak a rábai populáció és minden tiszai állomány között (páros $F_{ST} = 0,353$, $p < 0,05$). Ugyanakkor a Tisza vízrendszerének állományai között mindössze néhány szignifikáns különbséget sikerült kimutatni. Az AMOVA alapján a variancia 96%-a a Tisza állományain belül jelentkezett ($F_{ST} = 0,04$, $p = 0,029$) és a Mantel-teszt alapján a genetikai és a földrajzi távolság nem korrelált ($R = 0.15$, $p = 0,08$). Szignifikáns különbséget találtunk a kihalt rajnai állomány és a Tisza rendszer populációi között ($F_{ST} = 0.57$; ETPD, $p < 0.001$), valamint a Rába populációja és a Tisza rendszer állományai között ($F_{ST} = 0.68$; ETPD, $p < 0.0001$). Nem volt viszont szignifikáns különbség a kihalt rajnai állomány és a rábai populáció között ($F_{ST} = 0.02$; ETPD, $p = 0,61$). A rajnai és a rábai

populációk a páronkénti összehasonlítás során is szignifikánsan különböztek a Tisza vízrendszer egyes állományaitól. Az IMA elemzés szerint a két recens kárpát-medencei areafragmentum (Rába, Tisza) jelenleg elszigetelt egymástól. Viszont a MIGRATE elemzés során a Tisza vízrendszer felől a Rába irányába folyó múltbéli migráció forгатókönyve kapta a legmagasabb támogatást (AIC = 5,832; Akaike súly = 0,95).

Következtetések

1. vizsgálat: A telepek szerkezetének vizsgálata során megállapítottuk, hogy a telepek elsősorban a kötöttebb, agyagosabb, iszap- és üledékmentes partszakaszokon találhatóak, mely eredmény megerősítette a korábbi, főként megfigyelésekre és korlátozott mintavételekre alapozott ismereteket (Russev 1987; Sartori & mtsai. 1995; Andrikovics & Turcsányi 2001). Megfigyeléseink és eredményeink szerint az üledékkel borított aljzat nem alkalmas tartós járatok kialakítására. Az az új eredmény, hogy a lárvák sűrűsége nő a vízmélységgel, a Felső-Tiszán tapasztalható jelentős vízszint-ingadozásokkal magyarázható. A hirtelen apadások alkalmával a telepek felső része szárazra kerül, mely a lárvákat járataik elhagyására kényszeríti, ami a halak ragadozása miatt jelentős mortalitással járhat a mélyebb járatokat ásó lárvák mortalitásához képest.

2. vizsgálat: A telepek elhelyezkedésének vizsgálata során megállapítottuk, hogy a nagyobb egyedsűrűségű telepek általában a folyókanyarok kövezésmentes külső ívén, a sodorvonalhoz közel találhatóak. Az egyenes szakaszokon legfeljebb szórványos tiszavirág lárvá előfordulás figyelhető meg. Ez jól egyezik korábbi megfigyelések, felmérések (Gorové 1819, Andrikovics & Turcsányi 2001, Sartori és mtsai. 1995) eredményeivel. További fontos megfigyelésünk, hogy kisvízű időszakban megfelelő szintű vízborítás csak a kimélyült, kötöttebb mederanyagú folyókanyarok külső ívén illetve az egyenes folyószakaszokon a homokot szállító vagy aprókavicsot görgető sodorvonal alatt marad. Mivel az utóbbi a homok vagy kavics esetleges ülepedése és/vagy a sodorvonal gyakori átrendeződése miatt nem megfelelő a járatok ásására, ez magyarázhatja azt, hogy egyenes szakaszokon miért találtunk kevesebb telepet, valamint azt, hogy miért a folyókanyarulatok tekinthetőek a legstabilabb élőhelynek. Ezek alapján megállapítható, hogy az extrém vízszint-ingadozásoknak

jelentős szerepe lehet a tiszavirág eltűnésében a folyók egyenes (általában mesterséges vagy szabályozott) szakaszairól.

3. *vizsgálat*: A vizsgálat jelentőségét az adja, hogy elsőként végeztünk mennyiségi összehasonlítást egy partvédő kőszórással biztosított szakasz valamint egy természetes partszakasz tiszavirág-állományai között. Eredményeink igazolták, hogy a partvédő kövezés csökkenti az élőhely alkalmasságát a tiszavirág-lárvák számára, melynek következtében a járatásásra kevésbé alkalmas partszakaszon alig feleakkora állomány él, mit a természetes aljzattal rendelkező szakaszon.

4. *vizsgálat*: A vizsgálat fő eredménye, hogy polarometriás képalkotással bizonyítottuk, hogy a tivadari Tisza híd optikai barrier képez a kompenzációs repülést végző nőtény tiszavirágok számára a nőtények által követett polarizációs csatorna megszakításával. Ennek következtében a kompenzációs repülést végző nőtények döntő többsége megszakítja a kompenzáció repülését, nem jut át a hídon, a tojásainak lerakására a híd alatti szakaszon kényszerül. A levedlett lárvabőrök uszadákhálós gyűjtéséből származó adatok alapján a híd alatt a nőtények 2:1 arányú túlsúlya volt megfigyelhető, míg a híd felett nem volt eltérés az 1:1 ivararánytól. Mivel korábbi vizsgálatok alapján a tiszavirág-állományokra az 1:1-es hím:nőtény ivararány jellemző (Landolt és mtsai. 1997), eredményeink alátámasztják azt a hipotézist, hogy az ivararány eltolódása kapcsolatban lehet a híd barrier hatásával. Ennek egyik lehetséges mechanizmusa, ha a híd különbözőképpen hat a megtermékenyített és a nem megtermékenyített (szűznemzéssel szaporodó, azaz csak nőtényeket produkáló) nőtények számára. Mivel a párzás energiaigényes folyamat a tiszavirág esetén, a párzott nőtények valószínűleg alacsonyabb energiatartalékokkal rendelkeznek, mint a nem párzott nőtények, mely utóbbiak ezért hosszabb ideig és messzebbre repülhetnének, mint a párzott nőtények. Habár a arról nincs információnk, hogy a vizsgált nőtények átesetek-e párzáson, a kalorimetriás mérések alapján a hídnál gyűjtött nőtények energiatartalma alacsonyabb volt a híd alatt 1 km-rel gyűjtött példányokénak és nem különbözött a rajzás végén a hídnál haldokló nőtények energiatartalmától. Ezen eredmény szerint a hídnál visszafordulás és vízkereső viselkedés megnövekedett energiaköltségekkel járhat, mint a normál repülés. Ha a nem párzott nőtények nagyobb távolság megtételére képesek, mint a párzottak, akkor egyrészt a híd hosszabb szakasról fogja a nem párzott

nőstényeket összegyűjteni, másrészt megakadályozza, hogy a nem pározott nőstények jóval messzebbre repüljenek a folyón felfelé. Ezen hatások miatt elképzelhető, hogy a csak nőstény utódokat létrehozni képes partenogenetikus nőstények feldúsulása és koncentrált tojásrakása kialakíthatja és generációról generációra növelheti a nőstények túlsúlyát a híd alatti szakaszon.

5. *vizsgálat*: A legfontosabb eredménye a vizsgálatnak, hogy mind a Tisza vízrendszerében, mind pedig a Rábában magas haplotípus-diverzitást sikerült kimutatni. A genetikai sokféleség általunk talált mértéke összemérhető a nagy földrajzi elterjedésű, akár kontinentális léptékű áréával rendelkező vízirovarok diverzitásával. Ez a magas diverzitás elképzelhető akkor, ha a Tisza vízrendszere a múltban többször is refúgium-területként szolgált a tiszavirág számára. A Tajima D és a Fu féle F_s statisztikák alapján kimutatott, közelmúltbeli palacknyak hatás a faj elmúlt két évszázadban bekövetkezett állománycsökkenésével és visszaszorulásával magyarázható. Az effektív populációméret BSP alapján valószínűsíthető jelentős, távoli múltban végbement növekedése viszont feltételezhetően az utolsó eljegesedés végével, a folyók újraindulásával és újra benépesülésével lehet kapcsolatban. Ez a folyamat magyarázhatja a gyakoriaktól mindössze egy-egy mutációban eltérő szatellit-haplotípusok lokálisan magas számát is. A jelentős area csökkenés ellenére váratlanul magas genetikai sokféleség magyarázható abban az esetben, ha az utolsó jégkori refúgium és az antropogén élőhelypusztítás és degradáció következtében kialakult jelenkori refúgium földrajzilag átfed. Ennek magyarázata, hogy egy faj nagy területről történő teljes eltűnése valószínűleg kevésbé csökkenti az összes genetikai sokféleséget, ha az eltűnés csak a közeli múltban kolonizált területeket érinti. Ugyanakkor, már kismértékű areacsökkenés is jelentős genetikai sokféleség csökkenést eredményezhet, ha a kihalás az adott faj korábbi (pl. jégkori) refúgium-területeit érinti.

A gyakori haplotípusok mellett megjelenő saját szatellit-haplotípusok nagy száma alapján a rábai populáció és a tiszai állományok valószínűleg már a régmúltban elkülönültek egymástól, melyet több más eredmény is alátámaszt (páronkénti F_{ST} , ETPD, Mantel-teszt, IMA). A saját szatellit haplotípusok nagy aránya alapján ez az elszigeteltség már az utolsó eljegesedés idején is fennállhatott, azaz a glaciálist legalább két refúgiumban vészeltette át a tiszavirág. Ugyanakkor a MIGRATE elemzés eredményei alapján valamikor a régmúltban (az

utolsó jégkorszak előtt) a Tisza vízrendszer felől génáramlás volt megfigyelhető a Rába irányába, azaz lehetett olyan korábbi glaciális, melynek során egy összefüggő refúgiumterület volt. Ezen megfontolások alapján a rábai állomány valószínűleg soha sem pusztult ki.

A másik jelentős eredményünk, hogy a nagy földrajzi távolság ellenére sem találtunk szignifikáns genetikai különbséget a jelenlegi rábai és az egykori rajnai populáció között, míg a tiszai állományok szignifikánsan eltértek mindkettőtől. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az utolsó jégkorszak után a két Duna menti refúgium egyikéből északnyugati irányban indult meg az újra megjelenő folyók benépesülése, s ennek során települhetett be a faj a Rajna vízgyűjtőre, valószínűleg abból a refúgiumterületből, amelyből a Rába is.

Új tudományos eredmények

1. vizsgálat: A tiszavirág-lárvák jelenlétét és mennyiségét valamint a telepek szerkezetét meghatározó tényezők vizsgálatával rámutattam a vízmélység és a vízszintingadozás fontosságára, mellyel finomítottam a korábbi megfigyeléseket, miszerint a lárvák előfordulását és számát elsősorban az aljzat tulajdonságai határozzák meg.

2. vizsgálat: A korábbi vizsgálatokkal egybehangzóan kimutattam, hogy a Felső-Tisza vizsgált szakaszán sűrűbb tiszavirág telepek elsősorban a kanyarok külső ívéen találhatóak, ahol a sodorvonal a parthoz közel halad, de rámutattam arra is, hogy ez összefüggésben lehet a nagyobb vízmélységgel ezeken a helyeken. Megfigyeléseim szerint a telepek elhelyezkedését nagymértékben befolyásolhatják az utóbbi években megfigyelhető szélsőséges vízszintingadozások, különösen a megfelelő élőhelyek kisvízi periódusokban megfigyelhető beszűkülése miatt.

3. vizsgálat: Elsőként bizonyítottam mennyiségi (uszadékhálós) mintavétellel, hogy a természetes, kövezésmentes szakaszon szignifikánsan, mintegy 86%-kal több lárva kel ki rajzáskor, mint a partvédő kövezéssel ellátott partszakaszokon. Ezen eredmény alapján rámutattam, hogy a part hidromorfológiai tulajdonságainak megváltoztatása az élőhely degradációjához és a tiszavirág-állomány csökkenéséhez vezethet.

4. vizsgálat: Igazoltuk, hogy a Tivadar és Kisar közötti közúti híd optikai barriert képez a kompenzációs repülést végző tiszavirág nőstények számára, melynek következményeként a nőstények a hídnál

feltorlódnak, visszafordulnak vagy vízkereső viselkedést mutatnak és energia-veszteséget szenvednek. Másrészt kimutattam, hogy a híd alatti szakaszon a nőstények 2:1 arányú túlsúlya figyelhető meg, míg a híd felett nincs eltérés az 1:1 aránytól, azaz a híd mint optikai barrier az egyedi viselkedés módosításával akár populáció-szintű következményekhez vezethet.

5. *vizsgálat*: Kimutattuk, hogy a tiszavirág kárpát-medencei állományai jelentős genetikai sokféleséggel rendelkeznek, ami a jelenlegi elterjedési terület és az utolsó eljegesedés idején fennálló refúgium átfedésével magyarázható. Bizonyítottuk, hogy a tiszavirág populációja a Rábán nem a közelmúltban történt áttelepítés eredménye, hanem a Tisza vízrendszer állományaitól valószínűleg az utolsó eljegesedés óta elszigetelten fejlődő, önálló evolúciós történettel rendelkező állomány, ezért evolúciósan szignifikáns egység. Kimutattuk továbbá, hogy a tiszavirág esetén az utolsó eljegesedés idején valószínűleg legalább két refúgiumterület volt, melyek egyikéből történt meg a Rába és a Rajna vízrendszer illetve valószínűleg a hajdanvolt északnyugat-európai előfordulási helyek benépesülése, míg a tiszai állományok a másik refúgiumterületről származhatnak.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozok témavezetőimnek, **prof. dr. Dévai Györgynek** és **prof. dr. Lengyel Szabolcsnak**, akik, ha bármikor segítségre volt szükségem, készséggel álltak rendelkezésemre.

Külön szeretnék köszönetet mondani az egyes vizsgálatokban együttműködő kollégáknak, **dr. Bálint Miklósnak**, **prof. dr. Horváth Gábornak**, **prof. dr. Kriska Györgynek** és **dr. Prill Évának** nélkülözhetetlen segítségükért.

Köszönettel tartozok **prof. dr. Thomas Tittizernek**, **prof. dr. Peter Haase**-nak, egykori PhD hallgató társaimnak, a Hortobágyi Nemzeti Park dolgozóinak, illetve a kisari Kis-Tisza kempingből **Balla Bertalannak** és családjának, amiért a terepi és laboratóriumi munkák során, szükség esetén segítettek munkámat, előrehaladásomat. Köszönöm továbbá barátoknak, ismerősöknek, hogy a terepi mintavételek alkalmával a többé-kevésbé a kellő időben és többé-kevésbé a kellő számban megjelentek és segítettek munkámat.

A molekuláris genetikai vizsgálatokat a Deutsche Bundesstiftung Umwelt ösztöndíja tette lehetővé, míg a terepi kutatásokat több OTKA-

pályázat (NNF 78887, 85562, K 106133) valamint a BioFresh EU FP7 kutatási program (<http://www.freshwaterbiodiversity.eu>) támogatta.

Introduction

The Long-tailed Mayfly (*Palingenia longicauda*) is a mayfly (Insecta: Ephemeroptera) species used to occur in the majority of lowland rivers of Europe. In the 20th century, its populations declined and went extinct from large areas, and its geographical range contracted. As a result of this process, by the 1970s, Long-tailed Mayfly populations were known only from the Tisza river system and the Rába river in the Carpathian Basin, although some populations were found recently in the lower Danube region (Soldán et al. 2009).

It is not yet clear what reasons caused such a large-scale extinction and range contraction in the Long-tailed Mayfly. One hypothesis explains this based on climatic reasons (Haybach 2007), whereas a more widely accepted view suggests that the species became rare primarily due to the anthropogenic modification of the environment (Tittizer et al. 2008). It is plausible that both mechanisms played a role in the process during which the geographical range of the species decreased by 95% in the 19th and 20th centuries. Such a large-scale range loss usually results in a drastic decrease in the genetic variability of the species (Frankham 1996; Campos et al. 2010). It is thus reasonable to hypothesise that the genetic variability of populations remaining in the Carpathian Basin is also low. To test this hypothesis, we conducted a genetic analysis that aimed to assess the genetic variability of populations in the Carpathian Basin, with a more general aim to evaluate the vulnerability of the remaining populations.

Although the Long-tailed Mayfly successfully persisted in the Tisza river system during the last centuries and its extant populations appear to be stable, the populations are still exposed to the climatic and anthropogenic effects that presumably caused its range contraction. A substantial part of the remaining populations exist on hydromorphologically modified rivers often regulated by dams in the Tisza river system, which are still regularly exposed to riverbed alterations even today. Although we have a large-scale understanding of the impacts of certain types of these alterations on mayflies, there are no quantitative estimates of these effects, which could be used as a reference in the conservation of the Long-tailed Mayfly populations involved.

Finally, there are other rarely observed and little studied mechanisms that could have contributed to the range loss besides the ones generally

known. For example, we observed during field-work that the bridge between the villages of Kisar and Tivadar can function as a barrier for the female mayflies in compensation flight above the river because the majority of the females turn back or start water-searching behaviour at the bridge. We hypothesised that the bridge can disturb or inhibit the polarotactic water detection of females, and can thus lead to fragmentation of their river habitat, which can have various population-level consequences that can threaten the long-term persistence of the population involved. To test this hypothesis, we used various methods to collect data in the field and conduct measurements in the laboratory.

Aims of the study

The dissertation presents the results of five studies in three major topics on the Long-tailed Mayfly, with the following aims.

In the first topic, I first studied the factors influencing the occurrence and abundance of Long-tailed Mayfly larvae on the Upper Tisza between the villages of Gergelyugornya and Tarpa (18 river km). In particular, I studied the larval abundance of Long-tailed Mayflies and the abiotic variables influencing the structure of mayfly colonies at the Igonya river bend near the village of Gulács (*Study 1*). In the second part of this topic, I mapped the distribution of mayfly colonies in the studied river section (18 rkm) and searched for factors responsible for the patterns found (*Study 2*).

In the second topic, I studied the threats to the existing Long-tailed Mayfly populations and the mechanisms of these threats. In the first part, I assessed the extent of population decrease attributable to the riverbank riprap as a factor causing habitat degradation (*Study 3*). In the second part, I studied in more detail the optical barrier role of the Kisar bridge as a potential cause of habitat fragmentation and its other behavioural and population-level effects on mayflies (*Study 4*).

Finally, in the third topic, we conducted molecular genetic studies of the extant populations of the Carpathian Basin with the aims of (i) assessing the genetic variability of the extant populations of the Tisza and Rába rivers, (ii) comparing the extant Tisza and Rába as well as the extinct Rhein populations, and (iii) clarifying the origin of the Rába river population (*Study 5*).

Materials and methods

We used the following sampling methods and analyses in the studies detailed in the dissertation.

Study 1: We collected quantitative samples of mayfly larvae using a bager sampler on the right-hand side of the Igonya river bend near the village of Gulács in the Upper Tisza region. During sampling, we recorded the locally measured abiotic background variables (sedimentation, presence/absence of coarse-particle organic matter (CPOM), flow velocity, water depth) and recorded the number and estimated age class of larvae washed from the clay samples. The data were analysed by multiple logistic regression (presence/absence data) and general linear models (GLM, abundance data).

Study 2: We surveyed and mapped the mayfly colonies along the Upper Tisza between Vásárosnamény and Tarpa (696-714 rkm) in the autumn period, when water level was low. During the survey we proceeded along the riverbank in a motorboat and recorded the mayfly colonies using a high-accuracy GPS unit and classified them in three abundance categories based on the number of burrows per unit area (High-density, Intermediate, Low-density) and also recorded sporadic occurrences. Data collected during the survey were visualised and analysed using the ArcView 3.2 geographical information system package.

Study 3: In the study of the effect of riprap bank reinforcement on the abundance of mayflies, we collected larval exuvia (skin shed by mayfly imagoes) carried downstream by the river using a floating sampler in a riprap-covered section near the village of Kisar and in a natural, no-riprap section near the village of Gulács. Data from the days of swarming were compared using paired t-tests.

Study 4: We studied the optical barrier role of the bridge between villages Kisar and Tivadar using polarimetric image recordings. A detailed description of polarimetry is given in Horváth & Varjú (1997). We estimated the energy content of swarming females using calorimetry. We collected females accumulating at the bridge and females in compensation flight 1 km downstream from the bridge soon after their emergence from the water from a boat and also collected exhausted females floating on the water surface at the end of swarming. The captured females were stored in tanks cooled by liquid nitrogen and at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the laboratory. Calorimetric measurements were

conducted using a Parr 1341 calorimeter. Data were analysed by one-way ANOVAs and linear mixed models (GLME).

Study 5: We compared extant and extinct mayfly populations based on mitochondrial DNA sequences (mtCOI, 16S). We used freshly collected larvae from extant populations and individuals stored in natural history museums from the extinct Rhein population. DNA was extracted from the abdomen of the individuals based on the protocol of the manufacturer (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany). In the selective PCR of the DNA, we obtained a 600-bp-long section of mtCOI using Jerry and S20 primers and a 520-bp-long section of rRNA using 16Sar and 16SB2 primers. From the museum specimens, we could obtain a 196-bp-long section of mtCOI using newly designed primers (PalJS20Int-1F, PalJS20Int-1R). Sequencing was conducted using an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). The resulting sequences were aligned, edited and checked by the BioEdit software.

We visualised the genealogical relationships among haplotypes by a median-joining network using the software Network 4.5.1.6. We calculated the haplotype and nucleotide diversity of sequences using the software DnaSP v.5. We calculated F_{ST} values for pairwise differences and analysed genetic isolation between the populations using the Exact Test for Population Differentiation (ETPD). We searched for clues of demographical changes using Tajima's D and Fu's F_s selective neutrality tests, whereas the molecular variance of Tisza populations was analysed by AMOVA (Analysis of Molecular Variance) and calculated pairwise F_{ST} values using Arlequin 3.11. We studied the changes in effective population size by a Bayesian skyline plot constructed in BEAST 1.5.4. Finally, the probability of ongoing migration between the Rába and the Tisza populations was studied by Isolation by Migration (IMa) analyses, whereas the scenarios of migration between the Rába and the Tisza populations in the past were analysed by MIGRATE-N v. 3.2.6.

Results

Study 1: Based on samples collected from the riverbank in water up to 2.5 m deep, we concluded that the average density of Long-tailed Mayfly larvae increased with water depth. We also found that much fewer larvae occurred in colony sections covered by fresh silty sediments than in sections with compact clay not covered with fine sediments.

Study 2: In the survey of both riverbanks on 18 river km of the Upper Tisza, we found mayfly burrows on a total of 3161 m length, of which colonies in any of the three density categories were found on a total of 2167 m and sporadic occurrence of larvae was recorded on the remaining 994 m. In the sections inhabited by colonies, 23% of the colonies were in the high-density, 38% were in the intermediate and 39% were in the low-density category. Colonies were more frequent and had higher density on the outer arch of riverbanks close to the stream-channel.

Study 3: A comparison of the number of shed larval skins collected on the natural riverbank and on the riprap-covered riverbank showed that 86% more larval skins were carried away by the river from the natural riverbank than from the riprap-covered riverbank, which difference was highly significant.

Study 4: Polarimetric measurements showed that the light reflected by the water surface in the studied section was horizontally polarized with a moderate degree of polarization ($30\% < d < 50\%$), which thus forms a kind of “polarization channel” between the water surfaces shaded by the riverbank vegetation, which reflect vertically polarized light with a low degree of polarization ($0\% \leq d < 10\%$). Measurements also showed that the bridge and the water surface shaded by the bridge reflect non-polarized light ($d \approx 0\%$), which thus disrupts the polarization channel followed by females in compensation flight upstream on the river. As a result, disoriented females terminate their upstream flight, turn back or begin water-searching behaviour, which, with time, leads to the accumulation of females at the downstream side of the bridge. Calorimetric measurements showed that the energy content of females collected at the bridge was only 68% of those collected in flight 1 km downstream from the bridge and it did not differ from the energy content of females dying on the water surface at the end of swarming. This difference could not be explained by differences in dry body mass, body size variables or egg content. Based on the 17,637 shed larval skin collected by the floating sampler in nine days, we found that on the section downstream from the bridge the proportion of females was 67%, corresponding to a sex ratio of 2:1 females:males, whereas on the section upstream from the bridge the sex ratio did not differ from 1:1.

Study 5: We obtained a 936-bp-long sequence by merging a 472-bp-long mtCOI sequence and a 464-bp-long 16S sequence from specimens freshly collected in extant populations and a 196-bp-long sequence of mtCOI from museum specimens. We detected unexpectedly high genetic variation in both the Rába and Tisza system populations. In 245 specimens, we identified 87 haplotypes, of which only two were shared and 76 were unique to the Tisza system and 9 were unique to the Rába population. The haplotype diversity (H_d) of all extant populations was 0.875 and the nucleotide diversity (π) was 0.0031. The majority of the haplotypes showed close relationship with each other and showed a triple-star distribution with three common and numerous satellite haplotypes. Two of the three common haplotypes were found only in the Tisza system, whereas the third one was found in both the Rába and the Tisza system. The 196-bp mtCOI fragments from museum specimens mainly contained the same haplotypes as those found in the extant populations. We found significant deviation from selective neutrality in the Tisza and Rába populations ($Tajima D = 1.365$, $p = 0.007$; $F_u F_s = 24.766$, $p < 0.001$), indicating a recent bottleneck in both populations. The Bayesian skyline plot, however, suggested that effective population size increased about 2.5 orders of magnitude in the distant past. Pairwise comparisons showed significant differentiation between the Rába population and each Tisza system population (pairwise $F_{ST} = 0.353$, $p < 0.05$). However, there were only a few differences among populations of the Tisza system. AMOVA showed that 96% of the variation was within the populations in the Tisza system ($F_{ST} = 0.04$, $p = 0.029$), and there was no correlation between genetic and geographical distance (Mantel test, $R = 0.15$, $p = 0.08$). We found significant differences between the extinct Rhein population and the Tisza system populations ($F_{ST} = 0.57$; ETPD, $p < 0.001$) and between the Rába population and the Tisza system populations ($F_{ST} = 0.68$; ETPD, $p < 0.0001$). However, there was no difference between the extinct Rhein population and the Rába population ($F_{ST} = 0.02$; ETPD, $p = 0.61$). The extinct Rhein population and the Rába population also differed significantly from each Tisza population in pairwise comparisons. The IMA analysis showed that the two extant range fragments in the Carpathian Basin (Rába, Tisza) are currently completely isolated. The MIGRATE analysis, however, showed highest support for the scenario of past migration from the Tisza to the Rába population (AIC = 5.832; Akaike weight = 0.95).

Conclusions

Study 1: The study of colony structure showed that colonies are primarily located in compact clay riverbanks where no sedimentation occurs, which result supported previous findings based mostly on observations and limited sampling (Russev 1987; Sartori et al. 1995; Andrikovics & Turcsányi 2001). Our observations and results suggested that riverbanks covered by sediments are not suitable for digging permanent burrows. The new result that the density of larvae increases with water depth can be explained by the considerably fluctuation in the water level on the Upper Tisza. During sudden drops of the water level, the upper part of the colonies become dry, which forces the larvae to leave their burrows, which can in turn cause higher mortality due to predation by fish compared to the mortality of larvae that dig their burrows in deeper waters.

Study 2: The study of the placement of the colonies showed that colonies are usually found on the outer arch of river bends without riprap bank enforcement and close to the stream-channel. On straight river sections, only sporadic occurrences of mayfly larvae can be observed. This agrees well with the results of previous observations and surveys (Gorové 1819, Andrikovics & Turcsányi 2001, Sartori és mtsai. 1995). Another important observation was that in periods of low water, water of adequate depth remains only (i) in the deeper outer arch of river bends composed of compact riverbed material and (ii) under the stream-channel carrying sand or small pebbles in straight river sections. Because the latter is probably unsuitable for digging burrows by mayfly larvae due to occasional sand or pebble sedimentation and/or the frequent rearrangement of the stream-channel, this may explain why we found fewer colonies on straight sections and why river bends can be considered the most stable habitats for larvae. Based on these observations, it appears likely that extreme fluctuations in the water level can play an important role in the disappearance of the Long-tailed Mayfly from straight (usually artificial or regulated) river sections.

Study 3: The significance of this study is that it provides the first quantitative comparison of mayfly numbers between a riprap-covered section and a natural section. Our results provide evidence that the riprap coverage decreases the suitability of the riverbank for mayfly larvae, resulting in less than half the number of larvae in the section that

is less suitable for digging burrows than in the section with a natural riverbank.

Study 4: The main result of the study is that it provides evidence that the Tisza bridge at Tivadar represents an optical barrier for females in compensation flight by disrupting the polarization channel guiding the females during flight. As a result, the overwhelming majority of females terminate their flight and do not cross over the bridge and are forced to lay their eggs downstream from the bridge. Data from the collection of shed larval skins by the floating sampler showed a 2:1 ratio of females compared to males in the section downstream from the bridge and an even sex ratio (1:1) upstream from it. Because previous studies suggested that an even (1:1) sex ratio is typical in the Long-tailed Mayfly (Landolt et al. 1997), our results support the hypothesis that the biased sex ratio can be related to the barrier effect of the bridge. One mechanism for this can be if the bridge affects mated females and unmated, parthenogenetically reproducing females that produce only female eggs in different ways. Because mating is an energy-consuming process in mayflies, mated females probably have lower energy reserves than unmated females, which thus should be able to fly longer and to greater distances upriver than mated females. Although we have no information on whether the studied females had mated or not, calorimetric measurements showed that the energy content of females collected at the bridge was lower than that of females collected 1 km downstream from the bridge and did not differ from that of females dying at the end of the swarming. This result shows that turning back and water searching at the bridge can incur higher energy costs than normal flight. If the unmated females are able to cover larger distances than mated ones, then the bridge will accumulate non-mated females from a greater distance from downstream sections and will also prevent unmated females from flying much larger distances upriver. These two effects make it possible that the accumulation and concentrated egg-laying of the parthenogenetic females that produce only female offspring will lead to the appearance of the female bias and will increase its magnitude from generation to generation in the section downstream from the bridge.

Study 5: The most important result of this study is that we found high haplotype diversity in both the Tisza river system and the Rába river. The level of genetic diversity found can be compared to that of aquatic insects with very large, continental-scale geographical ranges.

Such a high genetic diversity is plausible if the Tisza river system functioned as a refugia area for the species multiple times in the past.

The recent bottleneck detected by the Tajima D and Fu Fs statistics can be explained by the population decline and range contraction of the species which occurred in the last two centuries. The substantial increase in the effective population size that occurred in the distant past based on the BSP, however, can be presumably related to the end of the last glacial period, when the rivers started to reappear and to be recolonised. This process can also explain the locally high number of satellite haplotypes that differ from the common ones in only one mutation step. The unexpectedly high genetic diversity despite the substantial recent range contraction can be explained if the last glacial refugium and the current refugium resulting from anthropogenic habitat destruction and degradation overlap geographically. One explanation for this is that the complete disappearance of a species from large regions will likely cause little loss in total genetic variability if the range loss occurs in areas that were only recently colonised by the species. Similarly, even a small loss of the range will probably result in substantial decrease in total genetic variability if the extinction involves previous, e.g. glacial, refugia of the species.

The high number of haplotypes unique to the Rába and the Tisza system suggests that the Rába and Tisza populations were genetically isolated in the distant past, which is also supported by other findings (pairwise F_{ST} , ETPD, Mantel-test, IMA). The high proportion of unique haplotypes also suggest that the isolation could already occurred by the last glacial maximum, meaning that the species persisted in at least two refugia during the last glacial maximum. However, results of the MIGRATE analysis showed that sometime in the distant past, there may have been gene flow from the Tisza system to the Rába population, which is possible if there was one continuous refugium during one of the glaciations that predated the last glacial maximum. These considerations suggest that the Rába population probably never went extinct.

Another important result is that we did not find significant genetic differentiation between the extant Rába population and the extinct Rhein population despite the large geographic distance, while the Tisza populations differed significantly from both. We thus can conclude that the recolonisation of the rivers reappearing after the last glacial

maximum progressed from one of the two refugial areas along the middle and lower Danube in a northwestern direction, and the species appeared in the Rhein system during this process from the same refugium that was the source of the Rába population as well.

New scientific results

Study 1: In the study of the factors determining the presence and quantity of larvae of the Long-tailed Mayfly and the structure of mayfly colonies I showed the importance of water depth and water level fluctuations, which thus refined previous observations that the occurrence and number of larvae are primarily determined by the properties of the riverbank.

Study 2: In agreement with previous studies, I found that dense mayfly colonies occur on the outer arch of the riverbanks, where the stream-channel is close to the riverbank, but I also showed that this can be related to the greater water depth in these locations. My observations showed that the location of the colonies are greatly influenced by the extreme fluctuations of the water level, which could be observed in recent years, particularly due to the decreased availability of suitable habitats in low-water periods.

Study 3: Using quantitative sampling by a floating sampler, I provided the first evidence that the number of larvae moulting into adults is significantly, 86% higher in sections with natural, no-riprap riverbanks than in sections with riprap-covered riverbanks. Based on this result, I pointed out that the alteration of the hydromorphological properties of the riverbank can lead to habitat degradation and a decline of the Long-tailed Mayfly population.

Study 4: We proved that the bridge between the villages of Kisar and Tivadar functions as an optical barrier to females in compensation flight, and forces the females to turn back or start water-searching behaviour and to suffer increased energy loss at the bridge. In addition, I showed that females outnumber males 2:1 in the section downstream from the bridge, whereas there is no deviation from a 1:1 sex ratio upstream from the bridge, therefore, the bridge as an optical barrier can lead to population-level consequences by modifying the individual behaviour of female mayflies.

Study 5: We showed that the Carpathian Basin populations of the Long-tailed Mayfly have substantial genetic variability, which can be

explained by the overlap between the last glacial refugium and the current distribution. We further provided evidence that the Rába population of the Long-tailed Mayfly is not the result of a recent introduction, rather, it has its own evolutionary history as it has developed in isolation from the Tisza populations probably since the last glaciation, therefore, the Rába population is an evolutionarily significant unit. Finally, we showed that there must have been at least two refugia of the species during the last glaciation, one of which was the source of the recolonisation of the Rába and Rhein river systems and probably other north-western European populations that are now extinct, whereas the Tisza populations probably originated from the other refugium.

Acknowledgements

I first thank my advisors, **prof. dr. György Dévai** and **prof. dr. Szabolcs Lengyel**, who were always available for help when I needed it. I would like to say thank you to colleagues collaborating in some of the studies for their indispensable help: **dr. Miklós Bálint**, **prof. dr. Gábor Horváth**, **prof. dr. György Kriska** and **dr. Éva Prill**. I also thank **prof. dr. Thomas Tittizer**, **prof. dr. Peter Haase**, my former fellow PhD students, staff at Hortobágy National Park and **Bertalan Balla** from the Kis Tisza camping in Kistar for their help in the field or the laboratory whenever it was necessary. I also thank friends and acquaintances for their showing up at more or less the right time in more or less the necessary numbers and for their help with my work. Molecular genetic studies were possible through funding from a fellowship from the Deutsche Bundesstiftung Umwelt, whereas field studies were supported by several grants from the National Scientific Research Fund of Hungary (OTKA NNF 78887, 85562, K 106133) and the BioFresh EU FP7 research programme (<http://www.freshwaterbiodiversity.eu>).

Irodalom – References

- Andrikovics S & Turcsányi I. (2001) Tiszavirág. Tisza Klub Füzetek 10:1-69.
- Campos PF, Kristensen T, Orlando L, Sher A, Kholodova MV, Götherström A, Hofreiter M, Drucker DG, Kosintsev P, Tikhonov A, Baryshnikov GF, Willerslev E & Gilbert MT. (2010) Ancient DNA sequences point to a large loss of mitochondrial genetic diversity in the saiga antelope (*Saiga tatarica*) since the Pleistocene. *Molecular Ecology* 19:4863–4875.
- Frankham R. (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10: 1500–1508.
- Gorové L. (1819) Egy különös tüneménynek, az úgynevezett Tiszavirágzásának leírása. *Tudományos Gyűjtemény* 8: 3-22.
- Haybach A. (2007) Hinweise auf ein historisches Vorkommen von *Palingenia longicauda* (Olivier, 1791) in Bayern (Insecta: Ephemeroptera). Evidence for a historical occurrence of *Palingenia longicauda* (Olivier, 1791) in Bavaria (Southern Germany) (Insecta: Ephemeroptera). *Lauterbornia* 59:77-83.
- Horváth G & Varjú D. (1997). Polarization pattern of freshwater habitats recorded by video polarimetry in red, green and blue spectral ranges and its relevance for water detection by aquatic insects. *J. Exp. Biol.* 200, 1155-1163.
- Landolt P, Sartori M & Studemann D. (1997) *Palingenia longicauda* (Ephemeroptera, Palingeniidae): From mating to the larval stage. Pages 15-20 in Landolt P; Sartori M. *Ephemeroptera & Plecoptera. Biology-Ecology-Systematics*. Mauron + Tinguely & Lachat, SA. Fribourg.
- Russev BK. (1987) Ecology, life history and distribution of *Palingenia longicauda* (Olivier) (Ephemeroptera). *Tijdschrift voor Entomologie* 130(1):109-127.
- Sartori M, Landolt P, Lubini V & Ruffieux L. (1995) Biological studies of *Palingenia longicauda* (Olivier) (Ephemeroptera, Palingeniidae) in one of its last European refuges – Abiotic characteristics and description of the habitat. Pages 263-272 in Corkum LD; Ciborowski JJH. *Current Directions in Research on Ephemeroptera*. Canadian Scholars' Press, Inc. Toronto.
- Soldán T, Godunko RJ, Zahrádková S & Sroka P. (2009) *Palingenia longicauda* (Olivier, 1791) (Ephemeroptera, Palingeniidae): Do refugia in the Danube basin still work?. In Soldán T., Papáček M., Boháč J. (2009) *Communications and Abstracts, SIEEC 21, 9 June 28 -*

- July 3, 2009. České Budějovice : University of South Bohemia, 2009. ISBN 978-80-7394-167-3, pp. 81-84. 2009, České Budějovice.
- Tittizer T, Fey D, Sommerhäuser M, Málnás K & Andrikovics S. (2008) Versuche zur Wiederansiedlung der Eintagsfliegenart *Palingenia longicauda* (Olivier) in der Lippe. Recolonization experiments of mayfly *Palingenia longicauda* (Olivier, 1791.) in the Lippe River in Germany. *Lauterbornia* 63:57-75.

Málnás Kristóf publikációi - Publications of Kristóf Málnás

Impakt faktoros közlemények - Papers with impact factor

- Bálint M, Málnás K, Nowak C, Geismar J, Vánca É, Polyák L, Lengyel Sz & Haase P. (2012) Species history masks the effects of human-induced range loss - unexpected genetic diversity in the endangered giant mayfly *Palingenia longicauda*. *PLoS ONE* 01/2012; 7(3):e31872. [IF: 3,73]
- Málnás K, Polyák L, Prill É, Kriska G, Hegedüs R, Dévai G, Horváth G & Lengyel Sz. (2011) Bridges as optical barriers and population disruptors in the mayfly *Palingenia longicauda*: an overlooked threat to freshwater biodiversity? *Journal of Insect Conservation* 15(6):823-832. [IF: 1,668]
- Móra A, Juhász P, Kiss B, Müller Z & Málnás K. (2014) The larva of *Parasetodes respersellus* (Rambur 1841) with notes on its habitat and European distribution (Trichoptera: Leptoceridae). *Zootaxa* 3841 (4): 563-572. [IF 2013: 1,06]

Egyéb referált közlemények - Other peer-reviewed papers

- Polyák L, Lengyel Sz, Málnás K, Prill É, Kriska Gy & Horváth G. (2010) Emberi létesítmények hatása a tiszavirág-állomány [*Palingenia longicauda* (Olivier, 1791)] nagyságára és ivararányára. *Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungarica* 21: 177-188.
- Málnás K, Lengyel Sz & Dévai Gy. (2005) A tiszavirág (*Palingenia longicauda*) lárváinak térbeli előfordulását befolyásoló tényezők vizsgálata. *Hidrológiai Közöny* 85: 91-93.
- 8.2.3 Egyéb megjelent vagy közlésre elfogadott publikációk jegyzéke
- Málnás K, Harangi S, Balogh Zs, Baranyai E, Braun M, Dévai Gy & Simon E (2014) Nehézfém analitikai vizsgálatok a Felső-Tisza és Szamos folyó hazai szakaszán. *Hidrológiai közöny* 94 (5-6), 62-65.

- Málnás K, B-Béres V, Kókai Zs & Simon E. (2014) Investigation of the diet of *Palingenia longicauda* (Olivier, 1791) larvae based on Diatoms – *Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungarica* 32: 85-94.
- Málnás K, Juhász P, Müller Z & Kiss B. (2012) First record of *Oligoplectrum maculatum* (Fourcroy, 1785) in Hungary (Trichoptera: Brachycentridae). *Folia Entomologica Hungarica*. 73. sz. 5-8.
- Bíró T, Szabó A, Láposi R, Gulyás G, Málnás K, Babocsay G & Tóth L. (2011) Az Erdőteleki Arborétum komplex élőhely-rehabilitációs programjához kapcsolódó állapotfelmérés eredményei bemutatása. *Hidrológiai közlöny*. (91. évf.) 6. sz. 25-29.
- Málnás K, Polyák L, Deák Cs, Tóth M. (2008) Makroszkopikus gerinctelen együttesek kvantitatív és kvalitatív vizsgálata a Ménes-patakon. *Hidrológiai Közölny* 88: 127-129.
- Tittizer T, Fey D, Sommerhäuser M, Málnás K & Andrikovics S. (2008) Versuche zur Wiederansiedlung der Eintagsfliegenart *Palingenia longicauda* (Olivier) in der Lippe. *Lauterbornia* 63:57-75.
- Málnás K, Papp L & Deák Cs. (2006) A Bódva folyó jellemzése kérészfaunája alapján *Acta biologica Debrecina. Supplementum oecologica hungarica*. 14. sz. 169-174.
- Málnás K, Zubor Á, Lengyel Sz, Prokisch J & Dévai Gy. (2006) A genetikai variabilitás generációk közötti megoszlása a tiszavirágnál [*Palingenia longicauda* (OLIVIER, 1791)]. *Hidrológiai Közölny* 86: 73-75.
- Csabai Z, Móra A, Boda P, Cser B & Málnás K. (2005) Contribution to the aquatic insect fauna of the northern part of the Bakony Mountains (Ephemeroptera, Coleoptera, Heteroptera and Trichoptera) *Folia Musei historico-naturalis Bakonyiensis*, 22. sz. 69-100.
- Deák Cs, Málnás K & Móra A. (2005) Kvantitatív és kvalitatív makrozoobenton vizsgálatok a Rakacán *Hidrológiai közlöny*, (85. évf.) 6. sz. 174-176.
- Móra A, Boda P, Csabai Z, Deák Cs, Málnás K & Csépes E. (2005) Contribution to the mayfly, aquatic and semiaquatic bug, aquatic beetle, caddisfly and chironomid fauna of the River Tisza and its main inflows (Ephemeroptera, Heteroptera: Nepomorpha and Gerromorpha, Coleoptera: Hydradephaga and Hydrophiloidea, Trichoptera, Diptera: Chironomidae) *Folia historico-naturalia Musei Matraensis*. 29. évf. 151-164.
- Móra A, Csépes E, Boda P, Deák Cs, Málnás K, Mátyus B, Grigorszky I, Nagy S, A & Dévai Gy. (2005) Makroszkopikus gerinctelen állategyüttesek felmérése 2004-ben a Tisza hossz-szelvényében és a főbb mellékfolyókon. *Hidrológiai közlöny*, (85. évf.) 6. sz. 94-97.

Csabai Z, Móra A, Boda P & Málnás K. (2004) Contribution to the mayfly, aquatic beetle, aquatic and semiaquatic bug and caddisfly fauna of watercourses in the Bihari-plain, E Hungary (Ephemeroptera larvae; Coleoptera: Hydradeephaga, Hydrophiloidea; Heteroptera: Nepomorpha, Gerromorpha; Trichopteralarvae) *Folia historico-naturalia Musei Matraensis*. 28. évf. 141-148.

Egyéb közlemények – Other publications

Wolf B, Angersbach R, Málnás K. Orosz A & Gregor T. (2009) Die Theißblüte – ein ungewöhnliches Naturerlebnis. *Natur und Museum* 140 (3/4): 72-77.

Konferenciák – Conferences

Málnás K., B-Béres V, Kókai Zs & Simon E. (2014) Investigation of the diet of *Palingenia longicauda* (Olivier, 1791) larvae based on Diatoms, poszter, XI. Makroszkopikus Vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia és 1st Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research; Szarvas, 2014. április 10-12.

Málnás K., Harangi S, Balogh Zs, Baranyai E, Szondi A, Dévai Gy & Simon E (2014) Toxic element analysis in larvae, adults and exuviae of *Stylurus flavipes* (Charpentier, 1825), poszter, XI. Makroszkopikus Vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia és 1st Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research; Szarvas, 2014. április 10-12.

Málnás K., Harangi S, Balogh Zs, Baranyai E, Nagy D, Braun M, Tóthmérész B, Dévai Gy, Simon E (2013) Nehézfém analitikai vizsgálatok a Felső-Tisza és a Szamos folyók hazai szakaszán Poszter, LV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2013. október 2-4.

Málnás K., Juhász P, Müller Z, & Kiss B. (2012) Duzzasztóművek makroszkopikus vízi gerinctelen közösségre gyakorolt hatásának vizsgálata a Hernádon és a Bán-patakon. Poszter, LIV. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2012. október 3-5.

Málnás K., Bálint M, Nowak C, Geismar J, Vánca É, Polyák L, Lengyel S & Haase P. (2012) Species history masks the effects of human-induced range loss – unexpected genetic diversity in the endangered giant mayfly *Palingenia longicauda*. Előadás, „ConGRESS” Conservation Genetic Resources for Effective Species Survival, Regional Workshop, Debrecen, Hungary, 2012. Március 14-16.

Málnás K., Bálint M, Nowak C, Geismar J, Vánca É, Polyák L, Lengyel Sz & Haase P. (2012) A tiszavirág [*Palingenia longicauda* (Olivier, 1791)] jégkori refúgiumai a Kárpát-medencében – recens és eltűnt

- tiszavirág populációk genetikai sokféleségének vizsgálata. Előadás, Hidrobiológus fórum, Nyíregyháza 2012. November 21.
- Bálint M, Málnás K, Nowak C, Geismar J, Polyák L, Lengyel Sz, Váncsa É & Haase P. (2011) A közép-dunai jégkori refúgiumok jelentősége a tiszavirág genetikai diverzitásának fennmaradásában. Előadás, VIII. „MaViGe” Makroszkópikus vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia, Jósvafő, 2011. Április 14-16.
- Polyák L, Lengyel Sz, Málnás K, Prill É, Kriska Gy. & Horváth G. (2010) Emberi létesítmények hatása a tiszavirág [*Palingenia longicauda* (Olivier, 1791)] állomány nagyságára és ivararányára. Előadás, VII. „MaViGe” Makroszkópikus vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia, Sümeg, 2010. Április 15-17.
- Kriska Gy, Hegedüs R, Polyák L, Málnás K, Lengyel Sz & Horváth G. (2010) Híd mint polarizációs gát: egy tiszai híd szerepe a tiszavirág (*Palingenia longicauda*) kolonizációjában. Előadás, VII. „MaViGe” Makroszkópikus vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia, Sümeg, 2010. Április 15-17.
- Málnás K, Juhász P, Kiss B, Kovács T & Müller Z. (2010) Ásó lárvatípusú kérészeink (Ephemeroptera: Ephemeridae, Polymitarcidae, Palingeniidae) hazai elterjedése, és az elterjedést befolyásoló tényezők vizsgálata. Előadás, VII. „MaViGe” Makroszkópikus vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia, Sümeg, 2010. Április 15-17.
- Málnás K, Lengyel Sz, Polyák L & Dévai Gy. (2008) Status and threats in the last European populations of *Palingenia longicauda* (Olivier) in north-eastern Hungary. Poszter, 12th International Conference on Ephemeroptera, Stuttgart, Németország.
- Málnás K, Polyák L & Deák Cs, (2008) Makroszkópikus gerinctelen közösségek mennyiségi, minőségi vizsgálata különböző mikrohabitatokon a Ménes-patakon. Poszter, V. „MaViGe” Makroszkópikus Vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia Nyíregyháza, 2008. Április 10-12.
- Málnás K & Deák Cs. 2007. Makroszkópikus gerinctelen közösségek vizsgálata a Bódva folyó kisvíző befolyóiban Poszter, IV. „MaViGe” Makroszkópikus vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia Tihany, 2007. Április 12-13.
- Nagy B, Málnás K & Andrikovics S. (2007) A tiszavirág (*Palingenia longicauda*) lárvák testméreteinek vizsgálata a Felső- és Közép-Tisza-vidéken. Előadás, IV. „MaViGe” Makroszkópikus vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia Tihany, 2007. Április 12-13.
- Málnás K, Lengyel Sz & Dévai Gy. (2007) Tiszavirág állománybecslés különböző módszerekkel, és a kőszórásos partbiztosítás tiszavirág állományra gyakorolt hatásának vizsgálata, a Felső-Tisza Gulács-

- Tarpai szakaszán. Poszter, 3. Szünzoológiai Szimpózium, Budapest, 2007. március 5-6.
- Málnás K, Papp L & Deák Cs (2006) A Bódva folyójellemzése kérészfaunája alapján. Poszter, III. „MaViGe” Makroszkópikus vízi Gerinctelenek Kutatási Konferencia Göd, 2006. Április 13-14.
- Málnás K, Zubor Á & Lengyel Sz. (2005) A genetikai variabilitás generációk közötti megoszlása a tiszavirágnál (*Palingenia longicauda*). Poszter, 47. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2005. Október 5-7.
- Móra A, Csépes E. Boda P, Deák Cs, Málnás K & Mátyus B. (2004) Makroszkópikus gerinctelen állategyüttesek felmérése 2004-ben a Tisza hossz-szelvényében. Poszter, 46. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2004. Október 6-8.
- Deák, Cs, Málnás K & Móra A. (2004) Kvantitatív és kvalitatív makrozoobenton vizsgálatok a Rakaca-patakon. Poszter, 46. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2004. Október 6-8.
- Málnás K & Lengyel Sz. (2004) A tiszavirág-lárva előfordulását befolyásoló tényezők vizsgálata. Poszter, 46. Hidrobiológus Napok, Tihany, 2004. Október 6-8.