

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Közelrokon fülemüle fajok elterjedése  
és állományaik jellemzése**

**Distribution and characterization of closely  
related nightingale species and their populations**

**Kováts Dávid**

Témavezetők:  
Dr. Varga Zoltán  
Dr. Harnos Andrea



**DEBRECENI EGYETEM**  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2016

„Az állatok a mienknél őszibb, sokkal tökéletesebb világban élnek és mozognak, végleges és tökéletes módon, az érzékek olyan terjedelmének birtokában, amelyet mi már réges-régen elveszítettünk, vagy el sem értünk.”

*Henry Beston*

## 1. Bevezetés

A posztglaciális szétterjedési folyamatok során a jég miatt addig refúgiumokba kényszerült fajok területei érintkezésbe kerültek (HEWITT 2001). Az európai mérsékelt-övi fajok rekolonizációja számos útvonalon történt (HEWITT 1999). A ma ismert kongenerikus fajok esetében ezek az útvonalak több esetben találkoztak, így hibridzónák jöttek létre. A hibridzónák általában olyan területeken találhatóak, ahol a testvérfajok élőhelyei szemben támasztott környezeti feltételei adottak (BARTON & HEWITT 1989, HEWITT 1999). A pleisztocéni klímaingadozások alatt számos közép- és közép-kelet európai rokon madárfaj (pl. *Parus caeruleus* – *P. cyaneus*, *Ficedula hypoleuca* – *F. albicollis*) állományai részben vagy teljesen átfedésbe kerültek (MARTIN 1990, SAETRE *et al.* 2001). Hibridizáló populációikban a morfológiai bélyegek keveredése gyakran megfigyelhető.

A pleisztocéni rekolonizáció során a *Luscinia* genus (Muscicapidae) két sibling faja, a fülemüle (*Luscinia megarhynchos* Brehm, 1931) és a nagy fülemüle (*Luscinia luscinia* Linnaeus, 1758) is másodlagos érintkezésbe került Közép- és Kelet-Európában, ahol elterjedési területük keskeny hibridizációs zónában átfed (SORJONEN 1986). A hibridzóna Németországtól Lengyelországon át Magyarország északkeleti részén keresztül egészen a Fekete-tenger vidékéig húzódik (REIFOVÁ *et al.* 2011).

A két *Luscinia* faj egymáshoz igen hasonló, azonban morfológiai (KVEREK *et al.* 2008), genetikai (KVEREK *et al.* 2008) és ökológiai jellemzőik (SORJONEN 1986), valamint az énekhang alapján (SORJONEN 1986, LILLE 1988, VOKURKOVÁ *et al.* 2013) általában elkülöníthetők.

A *L. megarhynchos* egész Euráziában elterjedt, politipikus faj (CRAMP 1988), hazánkban gyakori fészkelő (HARASZTHY 1998). A *L. luscinia* ázsiai géncentrumú monotipikus faj, elterjedésének nyugati pereme Magyarország keleti, északkeleti részére is behúzódik (CRAMP 1988, HARASZTHY 1998).

Az elmúlt időszakban a két fülemüle faj ökológiájának kutatására ugyan nagyobb hangsúly került a hibridzóna tőlünk északabbra fekvő részein (REIFOVÁ *et al.* 2011), azonban olyan összefoglaló munka, amellyel a szimpatrikus elterjedésű költőállományok több szempont alapján is jellemezhetők (pl. morfológiai különbségek, élőhelyhasználat, filogenetikai kapcsolatok) még nem készült. Mindezek miatt szükségesnek találtam, hogy a téma kapcsán felmerült kérdéseimre komplex vizsgálatok által adjak választ.

## 2. Célkitűzések

A fülemülék az egész Nyugat-Palearktisz területén elterjedt, rendszeres fészkelő fajok, könnyen befoghatók, mérhetők és jelölhetők. Gyakoriságuk ellenére, populációs szerkezetük és jellemzőik kapcsán azonban még igen hiányosak az ismereteink. Feltáratlan többek között a hazai állományok elterjedés-mintázata, morfológiai és genetikai jellemzői, de ezek élőhely-használatáról sincsenek érdemi adataink.

Célkitűzéseim az alábbiak voltak:

1. A kutatási területen elterjedt költőállományok részletes morfológiai leírása és összehasonlítása.
2. A hibridizáció mértékének meghatározása, a hibrid példányok morfológiai jellemzése.
3. A költőállományok filogenetikai kapcsolatvizsgálata.
4. A vedlési sajátosságok vizsgálata az egyes költőállományokban.
5. A költőállományok élőhelyhasználat-vizsgálata.
6. A *Luscinia luscinia* hazai állománycsökkenésének jellemzése.

### 3. Anyag és módszer

A mintavételeket 2006 és 2013 között négy mintavételi területen, a Bódva-folyó mentén, a Felső-Tiszán, a Szatmár–Beregi-sík területén és Bátorliget környékén végeztem. A madarak befogását egyeléeses módszerrel, május-június hónapokban, különböző méretű Ecotone<sup>®</sup> függönyhálókkal és magnetofon segítségével végeztem (BUSSE 2000). A madarakat SVENSSON (1992) ajánlásai alapján mértem, és a következő biometriai adatokat vettem fel (mm-ben): maximális szárnyhossz (MWL), első kézevező csúcsa és a szárnycsúcs közötti távolság ( $W^{ix}$ ), első kézevező leghosszabb kézfedőhöz viszonyított (relatív) hossza ( $rLP_1$ ), leghosszabb kéz- és karevező csúcsa közötti távolság (I/II.), második-, harmadik- és negyedik kézevező hossza ( $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$ ), farokhossz (TL), csőr hossz (BL), csőrszélesség (BW) és a csüd hossz (TA). A felsoroltakon kívül kiszámoltam a szárnyalakot jellemző szárnyhegyesség- ( $W^p$ ) és szárnyaszimmetria-indexeket ( $W^{sym}$ ) is (HOLYNSKI 1965). A szárnyméretek felvételére 1 mm-es osztású műanyag vonalzót, amíg a csüd- és csőrméretekre 0,1 mm pontos fém (Inox<sup>®</sup>) tolómérőt használtam. A madarak testtömegét (Bm) Pesola<sup>®</sup>-típusú rugós mérleggel mértem 0,1 g pontossággal.

A morfológiai összehasonlításokhoz összesen 121 egyedét mértem meg a négy vizsgálati területen (Bódva:  $n = 33$ , Felső-Tisza:  $n = 38$ , Szatmár-Bereg:  $n = 23$ , Bátorliget:  $n = 27$ ). Az állományok klasszifikálásához a *véletlen erdők* (RF) és *döntési fák* (CART) modelleket használtam. A morfometriai adatok statisztikai értékelése az R 2.15.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2010) programmal történt.

A mérések után a genetikai vizsgálatokhoz szükséges vért (30-50  $\mu$ l) az egyedek szárnyvénájából (*vena brachialis*) vettem, és feldolgozásig etanollal töltött Eppendorf-csővekben, -20 °C-on mélyfagyasztó szekrényben tároltam. A madarak gyűrűzés, mérés, és a DNS-vizsgálathoz szükséges vér levétele után a befogás helyén elengedésre kerültek.

A DNS láncok felszaporítása PCR eljárással, az egyedek filogenetikai származása a mitokondriális citokróm-c oxidáz-1 gén (COI) direkt szekvenálása alapján történt. Meghatároztam az egyedek COI bárkódjait, különbségeket kerestem a marker- és a mintacsoportok DNS szekvenciái között.

A szükséges markerszekvenciákat oroszországi, iráni, kazahsztáni, macedóniai, dél-koreai, mianmari, mongóliai, norvégiai és svédországi *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) adatai adták. A Magyarország területéről gyűjtött COI szekvenciák a *GenBank*-ban kerültek elhelyezésre. A bázisszekvenciák összerendezését és a filogenetikai fa készítését MEGA5 (TAMURA 2011), Modeltest 3.6 (POSADA & CRANDALL 1998) és MrBayes 3.2.1 (RONQUIST & HUELSENBECK 2003) programokkal végeztem.

A madarak vedlésének vizsgálatához a terepen egyedi vedlőlapokat töltöttem ki, majd ezeket értékeltem.

Megvizsgáltam továbbá az egyes állományok élőhelyhasználatát. Az élőhelyek térképi lehatárolását erdészeti adatok alapján térinformatikai módszerekkel végeztem, amelyhez ArcView 3.1 térképszerkesztő programot használtam (ESRI 1998). A preferencia értékeket ( $P_i$ ) az Ivlev-index segítségével (IVLEV 1961) számítottam ki.

## 4. Új tudományos eredmények és értékelésük

1. Átfogóan vizsgáltam a két koegzisztens fülemüle faj, a *Luscinia megarhynchos* és *L. luscinia* szimpatrikus elterjedésű populációinak morfológiai-, vedlési jellemzőit, filogenetikai kapcsolatrendszerét és élőhelyhasználatát Magyarország északkeleti régiójában 2006 és 2013 között. A morfológiai és genetikai vizsgálatokkal megpróbáltam feltérképezni, hogy találok-e a két faj hibridizációjára utaló jeleket, ha igen, milyen mértékben. Ennek kapcsán összefüggéseket kerestem a hibridizáció, és a *L. luscinia* korábban feltételezett hazai állománycsökkenése között.
2. Négy fülemüle populáció (elnevezésük: 'Bódva', 'Felső-Tisza', 'Szatmár-Bereg' és 'Bátorliget') morfológiai jellemzőit vizsgáltam. Tizennégy biometriai változó alapján összesen 121 egyed került mérésre majd összehasonlításra. Meghatároztam a költőállományok elkülönítését segítő morfológiai változókat, majd a populációkat ezek alapján összehasonlítottam.
3. A lényeges morfológiai változók megítélésére a RF és CART osztályozó módszereket eredményesen alkalmaztam.
4. Megállapítottam, hogy a négy állományt a második-, harmadik-, negyedik kézevező hossza ( $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$ ), valamint a csőrhossz (BL) és a csőrszélesség (BW) alapján lehet elkülöníteni leginkább. Ezek között nagyfokú korreláltságot is tapasztaltam.

5. A morfometriai vizsgálatok alátámasztották továbbá azt is, hogy a felső-tiszai *L. luscinia* típuspéldányai eltűntek. A kapott morfológiai eredmények arra utalnak, hogy a területen a *L. luscinia* × *L. megarhynchos* interspecifikus hibridjei és a *L. megarhynchos* fordulnak elő. Az alkalmazott módszerek (lineáris modell, Leveneteszt, RF, CART, diszkriminancia analízis) alapján a szatmár-beregi populáció a bódvai, a felső-tiszai és a bátorligeti állományoktól határozottan elkülöníthető, így ezt morfológiailag önálló csoportnak kell tekintenünk.
6. Mivel eredményeim alapján az általam alkalmazott modellekkel (különösen a RF, CART) vélhetően más problémás taxonok összehasonlítása is hatékonyan elvégezhető, javaslatot tettem ezek széleskörű használatára.
7. Megállapítottam, hogy a megmért egyedek (n = 121) 6,92 %-a (n = 9) interspecifikus hibrid. A hibridek magas aránya arra utal, hogy a *L. megarhynchos* által egy nagyobb fokú introgressziós nyomás zajlik. A morfológiai karakter eltolódások és a hibridek aránya stabil, növekvő hibridpopuláció meglétére utalnak.
8. A morfológiai jellegeket bizonyos szintű fenotípusos plaszticitás is jellemzi. Kialakulásukra nem csak genetikai faktorok, hanem a környezeti- és egyéb ökológiai tényezők (pl. hőmérséklet, élőhely-szerkezet, elérhető táplálékforrások) is hatással vannak (AGRAWAL 2001). A csörméret plaszticitását például a fiókakori fejlődés alatti kedvezőtlen feltételekre adott válasz is okozhatja,

mivel a limitáló készletek hasznosítása morfológiai változásokat indukál (GIL *et al.* 2008). A fülemülék esetében bizonyított, hogy a táplálkozóhely (talajszint) és a kullancsok általi ektoparazitáltság szorosan összefügg (HORNOK *et al.* 2014). Mivel az általános ökológiai jellemzők (pl. étrend, táplálkozóhely magassága, élőhely specializáció, elterjedési terület) jelentősen befolyásolják az ektoparaziták általi fertőzöttség arányát (HORNOK *et al.* 2014), a parazitáltság mértéke szintén speciális szelekciós tényezőként játszhat közre az élőhelyek kiválasztásában. Következésképpen, adott madárközösségekben a környezethez való alkalmazkodás is elősegítheti az eltérő morfológiai jellegek kialakulását és elterjedését (TELLERÍA & CARBONELL 1999).

9. A filogenetikai eredmények alapján megállapítottam, hogy a vizsgált populációk a kelet-európai állományokkal mutatnak rokonságot, azaz posztglaciális szétterjedésük is ebben az irányban történhetett. A DNS szekvenálás segítségével, a szatmár-beregi populációban olyan önálló haplotípus csoportot találtam, amely *L. megarhynchos* morfológiával, de *L. luscinia* mtDNS-sel rendelkezett (Bockerek-erdő). A mitokondriális introgresszió alapján arra lehet következtetni, hogy a korábbiakban a *L. luscinia* erről a területről kiszorította a *L. megarhynchos*-t és azt periférikus élőhelyekre izolálta. Mivel azonban a *L. megarhynchos*-szal ellentétben a szatmár-beregi populációban nem találtam olyan egyedeket, amelyek tipikus *L. luscinia* morfológiával és

mitokondriális DNS-sel rendelkeznek, e faj szülői példányainak jelenléte egyelőre nem bizonyítható, így további vizsgálatok szükségesek.

10. A molekuláris óra által kapott divergencia-időértékek alapján, a két faj az utolsó pleisztocéni glaciálist megelőzően, mintegy 13 000 évvel ezelőtt válhatott el egymástól. A szatmár-beregi *L. luscinia* klád a kelet-európai populációktól kb. 1300 évvel ezelőtt szakadhatott le, majd innen kolonizálta a térséget. Ennek alapján a két faj közötti génáramlás a várákosokkal ellentétben nem az elmúlt évtizedekben, hanem már jóval korábban megkezdődhetett. Következésképpen, nem valószínű, hogy a két faj közötti introgressziós folyamat csak az utóbbi időben indult volna meg, esetleg csak antropogén hatásra. Mivel a másik három állomány genetikailag homogénnek adódott, valószínű, hogy az elkülönülésük óta eltelt idő nem volt elegendő arra, hogy jelentős mértékű mutáció halmozódjon fel a mitokondriális génjeikben. A genetikai vizsgálatok további érdekes eredménye, hogy az interspecifikus hibridek filogenetikailag a bátorligeti csoporthoz állnak közelebb. A bátorligeti és a kelet-európai állományok között meglévő szoros kapcsolat pedig arra utal, hogy a bátorligeti refúgium egy rekolonizációs kiindulópont lehetett a környező élőhelyek felé.
11. Vizsgáltam a populációk költési időszak alatti vedlését. Csak a bátorligeti területen voltak vedlő egyedek ( $n = 24$ ), ami az összes vizsgált példány 15,6 %-a. Ezek vedlése az őszi postnuptiális teljes vedléssel megegyező mintázatú volt. A kézevezők

cseréjét azonban június elején már részben befejezték, tehát a vedlést a szokásosnál hamarabb (kb. 30-40 nappal korábban, májusban) kellett megkezdjék. Kilenc példány a karevezőket kihagyva folytatta a vedlést. Ilyen vedlési mintázatot és időzítést, az adult fülemülék esetében még nem észleltek. Mivel a rendellenes vedlés csak hímeknél fordult elő, ezért ez nem magyarázható hibridsterilitással. Az eltérő időzítés hátterében más tényezők (pl. élőhelyváltozás, genetikai hatások, elérhető táplálékforrások minősége és mennyisége, időzítés-stressz) állhatnak. A kapott mintázat egyben a vedlés populációs szintű differenciáltságára is utal. Az eredmény újszerűsége, hogy a vedlési rendszer még a genetikailag hasonló állományok között sem mindig egységes. A költési szezon alatti teljes vedlés teljesebb körű megértését külön program keretében javasolt vizsgálni a későbbiekben.

12. Az élőhelyhasználat-vizsgálatokkal igazoltam, hogy az állományok különböző természetességű élőhelyeket preferálnak, és nem kizárólag a legjobb minőségűeket foglalják el. Megállapítottam, hogy a revírek kiválasztását nem befolyásolja az élőhelyek természetessége, amely adaptív plaszticitásra utal. A hibridizációs övezet költőállományait ezért összességében a kevert élőhelyhasználat jellemzi. A megvizsgált területek esetében tehát a territóriumok kiválasztása a mikroélőhellyel szemben támasztott egyéb igényektől (pl. megfelelő aljnövényzet borítottság megléte a fiókanevelés miatt) is függ.

13. A felső-tiszai *L. luscinia* maradványpopulációja kapcsán a DNS vizsgálatok PCR-negatív eredményt adtak, vagyis ez a faj a korábbi költőhelyéről eltűnt. Ennek fő oka egyrészt az élőhelyfragmentáció (szegélyhatás), másrészt a *L. megarhynchos*-szal való intenzív hibridizáció, és az ennek következtében előállt, a posztzigotikus izolációból eredő hibridsterilitás. Az élőhelyszerkezetek átalakulása a fülemülék intenzív kompetícióját tehát erősíti, amelyet az interspecifikus hibridek magas aránya is igazolt.

## 1. Introduction

During processes of postglacial recolonization, areas of species displaced into refuges came into secondary contact due to ice sheet (HEWITT 2001).

Recolonization of such species living in temperate zones of Europe was occurred in several routes (HEWITT 1999). Regarding congeneric species known today, these routes were met in most cases, thus, hybrid zones (suture zones) have been developed. Hybrid zones are commonly found in regions where the environmental conditions of native habitat of both sister species meet (BARTON & HEWITT 1989, HEWITT 1999). During the Pleistocene climate fluctuations, populations of many Central- and Central-Eastern European closely related passerines (e.g. *Parus caeruleus* – *P. cyaneus*, *Ficedula hypoleuca* – *F. albicollis*) have been partially or fully overlapped (MARTIN 1990, SAETRE *et al.* 2001). The mixture of

morphological characteristics is regularly occur in their hybrid populations.

After the geographical isolation, the two sibling species of genus *Luscinia* (Muscicapidae) the common nightingale (*Luscinia megarhynchos* Brehm, 1931) and the thrush nightingale (*Luscinia luscinia* Linnaeus, 1758) came into secondary contact in central- and eastern Europe, where their distributional area is partially overlap in a narrow hybrid zone from north Germany via Poland and Hungary to the Black Sea (REIFOVÁ *et al.* 2011). Although the two species are relatively similar, they can be distinguished by their morphology (KVEREK *et al.* 2008), genetical (KVEREK *et al.* 2008) and ecological characteristics (SORJONEN 1986) and song (SORJONEN 1986, LILLE 1988, VOKURKOVÁ *et al.* 2013). The *L. megarhynchos* is polytypic (SVENSSON 1992), widely distributed in Eurasia (CRAMP 1988), frequent breeding and migratory species in Hungary (HARASZTHY 1998). The *L. luscinia* is a monotypic species, widespread in temperate Asia, Western edge of its area extends into northeastern part of Hungary (CRAMP 1988, HARASZTHY 1998).

Recently, ecological research on nightingales had a greater emphasis in the northern part of their hybrid belt (REIFOVÁ *et al.* 2011). However, no comprehensive analysis has been completed which characterize closely related populations breeding sympatrically in several aspects (e.g. morphological differentiations, habitat-preferences, moult, phylogenetic relationships). Thus, I found it necessary to give answers to all questions emerged in this topic by complex investigations.

## 2. Aims

Nightingales occur in the whole region of the Western Palearctic as regularly breeding species, which are easy to catch, measure and mark, respectively. Despite the commonness of the nightingale species, our knowledge is very incomplete in connection with the structure and characteristics of their populations. Distributional, morphological and genetically pattern of the Hungarian population of the nightingales are unexplored inter alia, but no meaningful data on their habitat-preferences, respectively. My aims were specified as follows to:

1. Describe and compare morphological characteristics of the breeding population occur in the study area.
2. Specify the rate of hybridization and the morphological description of hybrid individuals.
3. Investigate phylogenetical relationships of the breeding populations.
4. Analyse the moulting strategy of breeding nightingales.
5. Investigate the habitat-preferences of the breeding populations.
6. Explain why reduced the population of the species *Luscinia luscinia* from the questionable areas.

### 3. Materials and methods

Samplings were carried out at four study areas as in River Bódva, Felső-Tisza, Szatmár-Bereg Landscape Protection Area and in the surrounding of Bátorliget, respectively in 2006-2013. Birds were captured during the peak of the breeding season in May and June between 2006 and 2010 using different sizes of Ecotone<sup>®</sup> mist-nets by tape luring (BUSSE 2000). All birds were measured in millimeters based on the recommendations defined by SVENSSON (1992) in the following succession: maximal wing length, wing index (difference in length between the first primary and wing tip), distance between the wing point and the first secondary, relative length of the first primary, length of the second-, third- and fourth primary, tail length, bill length (measured to skull), bill width (measured at frontal margin of nostrils) and tarsus length. Further, indexes of wing-pointedness and wing-symmetry were calculated as well (HOLYNSKI 1965). Wing characteristics were measured with a plastic ruler to the closest 1 mm, while for measure of the bill and tarsus a metal calliper with the accuracy of 0.1 mm was used. Body mass was recorded to the closest 0.1 g using a 60-g Pesola spring scale.

In total, 121 individuals were measured in the four study areas (Bódva: n = 33, Felső-Tisza: n = 38, Szatmár-Bereg: n = 23, Bátorliget: n = 27) and *random forest* (RF) and *classification and regression trees* (CART) were used for morphological comparisons. Statistical analyses were carried out using the software R 2.15.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2010).

Further, a small (~30-40  $\mu$ l) blood sample from the brachial vein was collected and deposited in 1.5-2 cm<sup>3</sup> Eppendorf-tubes filled with ethanol in a deep freezer at -20 °C for process. After measurement and blood sampling, all birds were ringed and released into the wild.

Alignment of all DNA sequences and to set up their phylogenetic relationships software MEGA5 (TAMURA 2011), Modeltest 3.6 (POSADA & CRANDALL 1998) and MrBayes 3.2.1 (RONQUIST & HUELSENBECK 2003) were used. A PCR procedure was used to amplify the DNA strands and the phylogenetic origin of the individuals was determined on the basis of analyzing mitochondrial cytochrome-c oxidase-1 (COI) sequences. The COI barcodes of each individual were described, and genetically differences between the marker genes and their DNA sequences were identified. The marker sequences of the *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) originated from Russia, Iran, Kazakhstan, Macedonia, South Korea, Myanmar, Mongolia, Norway and Sweden. Each COI sequences collected in the study area were also deposited in the *GenBank*.

To analyze the moult of birds several a special moulting-sheets were used in the field.

In addition, habitat-preferences of the four populations were investigated, respectively. Habitat types were described based on forestry data using ArcView 3.1 program (ESRI 1998). Values of habitat-preferences ( $P_x$ ) were calculated by Ivlev-index (IVLEV 1961).

## 4. New scientific results and conclusions

1. I comprehensively examined characteristics of morphology, moulting, phylogenetic relationships and habitat-preferences in a contact zone of two sister species of nightingales *Luscinia megarhynchos* and *L. luscinia* in North-Eastern Hungary between 2006 and 2013. I would like to find signs for hybridization of the two species with morphological and genetic studies and if so, in what extent. In this context, I was looking for relationships between hybridization and hypothetical decreasing of the population of *L. luscinia* bred near the Felső-Tisza, previously.
2. I investigated morphological characteristics of four populations (called: 'Bódva', 'Felső-Tisza', 'Szatmár-Bereg' and 'Bátorliget') in the northeastern region of Hungary. In total, 121 individuals were measured and compared with each other on the basis of fourteen different biometrical characteristics.
3. For the prediction of relevant morphological variables RF and CART methods were effectively used.
4. The statistical results confirmed that the four populations can primarily be characterized by on the basis of the relative length of second-, third- and fourth primary ( $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$ ) and on bill length (BL) and bill width (BW) secondly, while other morphological traits showed greater similarities between the populations. Further, these variables highly correlated with each other.

5. The morphometric analysis also confirmed that nominotypical *L. luscinia* was extinct from the Felső-Tisza. The morphometrical results showed that interspecific hybrids of *L. luscinia* × *L. megarhynchos* and *L. megarhynchos* can only be found in the Felső-Tisza and its surroundings, presently. Based on utilized methods (linear model, Levene's-test, random forests, classification and regression trees, and linear discriminant analysis) Szatmár-Bereg' population was significantly differed from population of Bódva and Felső-Tisza and Bátorliget. Thus, individuals of the Szatmár-Bereg are considered as a morphologically separated group.
6. According to my findings, extensive use of classification models of RF and CART are recommended for similar comparative morphological studies.
7. In total, 6.92% of measured individuals were interspecific hybrids (n=9). It suggests a high level pressure of introgression takes place from the *L. megarhynchos* to *L. luscinia*. The morphological character displacements and the proportion of hybrids refers a stable hybrid population.
8. Morphometrical characteristics are provided by phenotypic plasticity. Their developments are also affected not only by genetic but environmental and ecological factors (e.g. temperature, habitat structure, available food sources) (AGRAWAL 2001). Recent evidence suggests that phenotypic plasticity in bill morphology can occur in response to poor conditions during development (GIL *et al.* 2008).

Regarding *Luscinia* species, it is proven that the feeding place (ground level) and the rate tick infestation are closely related (HORNOK *et al.* 2014). Since the general ecological characteristics (e.g. diet, height of feeding place, habitat specialization, distributional area) significantly affect the rate of infestation by ectoparasites (HORNOK *et al.* 2014), the prevalence of parasite infestation may also play as specific selection factor in habitat selection. Consequently, adaptation to the environmental conditions can promote the development of different morphological characteristics in specified bird communities (TELLERÍA & CARBONELL 1999).

9. The phylogenetic results indicated that studied populations clustered to haplotypes of Eastern Europe. Using direct sequencing of DNA, a strong evidence for a haplotype group of Szatmár-Bereg (Bockerek Forest) was found, which had *L. megarhynchos* morphology but of *L. luscinia*' mtDNA. Based on the mitochondrial introgression I suggest that former stand of *L. luscinia* ousted *L. megarhynchos* from this area to peripheral habitats. However, I did not find individuals which both phenotypically and morphologically are *L. luscinia* in the Szatmár-Bereg contrary to the *L. megarhynchos*. Thus, presence of parental specimens of *L. luscinia* has not been proven yet, thus, further research is needed.
10. Based on divergence time values obtained by molecular clock, the two coexistent *Luscinia* species might be separated before the last

Pleistocene glaciation cca. 13.000 years ago. Szatmár-Bereg' *L. luscinia* population might be diverged from its Eastern European stands approximately 1.300 years ago, and then colonized the studied region. It suggests introgression process did not begin in the past decades, but much earlier. Consequently, it is unlikely that gene flow have been started recently between the two species by human impact solely. The other three populations were genetically homogeneous suggest there was not enough time to accumulate a significant mutation in their mitochondrial genes to separation. Further interesting results of the genetic analyses was that interspecific hybrids are closest to the Bátorliget' population nor the others. The phylogenetic relationship between Bátorliget and the Eastern European populations suggests that isolated refuge nightingale' stand of Bátorliget might be a focal point for recolonization to the surrounding areas.

11. I investigated the moulting system of the four populations during the breeding season. Twenty four (15.6%) moulting individuals of all investigated birds were captured in Bátorliget only. Their showed the common postnuptial moulting pattern. However, the exchange of the primaries has already completed partially in those individuals at the beginning of June, so they had to begin the moulting earlier than usual (about 30-40 days earlier in May). Nine birds almost finished the change of the primaries, but their moulting did not extend to the secondaries. This strategy has not been

reported in adult nightingales under breeding period in Hungary yet. The early moulting could not be caused by hybrid sterility in case of male individuals. Thus, it suggests that early onset of moulting process may be a natural part of those population's annual life cycle. The possible explanations for this outlier moulting pattern can be found in environmental changes, the quality and quantity of available food resources or time stress for example. This novel result showed that moulting system is not always uniform between genetically closely related populations, but some of them follow alternative strategies. However, to obtain a better overview of moult during the breeding season, further research is recommended.

12. I confirmed that the four investigated populations did not differ significantly in their habitat-preferences. I found that selection of territories is not affected by the naturalness of habitat types which refers to adaptive plasticity. Thus, in case of investigated sympatric populations of nightingales, habitat selection might be depended on other special requirements for microhabitats (e.g. presence of suitable thickets and undergrowths) for nestlings.
13. Based on the present results, in relation to the population of the Felső-Tisza DNA tests gave PCR-negative result for *L. luscinia*, suggests this species has disappeared from its former breeding stand. The first potential cause is the habitat fragmentation, while on the other hand, the intense hybridization with *L. megarhynchos* and as a result,

the hybrid sterility by post-zigotic isolation. Intensive competition of nightingales is strengthened by the modification of the habitat structures as evidenced by high rates of interspecific hybrids.

## **5. Felhasznált irodalom / References**

- AGRAWAL A.A. (2001): Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294: 321–326.
- BARTON N.H. & HEWITT M. G. (1989): Adaption, speciation and hybrid zones. *Nature* 341: 497–503.
- BUSSE P. (2000): Bird Station Manual. SE European Bird Migration Network. University of Gdańsk. 264 p.
- CRAMP S. (1988): The Birds of the Western Palearctic Vol V. Oxford University Press, Oxford, New York, 1063 p.
- ESRI, Inc. (1998): ArcView GIS Version 3.1, Redlands.
- GIL D., BULMER E., CELIS P. & LOPEZ-RULL I. (2008): Adaptive developmental plasticity in growing nestlings: sibling competition induces differential gape growth. *Proceedings of the Royal Society B*. 275: 549–554.
- HARASZTHY L. (1998): Magyarország madarai. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 274–275 p.
- HEWITT G.M. (1999): Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.
- HEWITT G.M. (2001): Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537–549.

- HOLYNSKI R. (1965): The methods of analysis of wing-formula variability. *Notatki Ornithologiczne* 6: 21–25.
- HORNOK S., KOVÁTS D., CSÖRGŐ T., MELI L.M., GÖNCZI E., HADNAGY ZS., TAKÁCS N., RÓBERT F. & HOFFMANN-LEHMANN R. (2014): Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. *Parasites & Vectors* 7: 128.
- IVLEV V.S. (1961): Experimental ecology of the feeding of fishes. Yale University Press, New Haven, 302 p.
- KVEREK P., STORCHOVÁ R., REIF J. & NACHMAN W.M. (2008): Occurrence of a hybrid between the Common Nightingale (*Luscinia megarhynchos*) and the Thrush Nightingale (*Luscinia luscinia*) in the Czech Republic confirmed by genetic analysis. *Sylvia* 44: 17–26.
- LILLE R. (1988): Species-specific song and mixed singing of Nightingale and Thrush Nightingale (*Luscinia megarhynchos*, *L. luscinia*). *Journal of Ornithology* 129: 133–159.
- MARTIN J-L. (1990): The *Parus caeruleus* complex revisited. *Ardea* 79: 429–438.
- POSADA D. & CRANDALL K.A. (1998): MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2010): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- REIFOVÁ R., REIF J., ANTCZAK M. & NACHMAN M.W. (2011): Ecological character displacement in the face of gene flow: Evidence from two species of nightingales. *BMC Evolutionary Biology* 11: 138.

- RONQUIST F. & HUELSENBECK J.P. (2003): MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- SAETRE G.P., BORGE T., LINDELL J., MOUM T., *et al.* (2001): Speciation, introgressive hybridization and nonlinear rate of molecular evolution in flycatchers. *Molecular Ecology* 10: 737–749.
- SORJONEN J. (1986): Mixed singing and interspecific territoriality – consequences of secondary contact of two ecologically and morphologically similar nightingale species in Europe. *Ornis Scandinavica* 17: 53–67.
- SVENSSON L. (1992): Identification Guide to European Passerines. Stockholm. 368 p.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M. & KUMAR S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731–2739. Epublication 4 May 2011.
- TELLERÍA J.L. & CARBONELL R. (1999): Morphometric variation of five Iberian Blackcap *Sylvia atricapilla* populations. *Journal of Avian Biology* 30: 63–71.
- VOKURKOVÁ J., PETRUSKOVÁ T., REIFOVÁ R., *et al.* (2013): The Causes and Evolutionary Consequences of Mixed Singing in Two Hybridizing Songbirds Species (*Luscinia* spp.). *Plos ONE* 8(4): e60172.

## 6. Tudományos tevékenység jegyzéke

### 6.1. Az értekezés alapjául szolgáló megjelent referált publikációk

KOVÁTS D., VÉGVÁRI ZS. & VARGA Z. (2013): Morphological patterns of a nightingale population in a contact zone of *Luscinia megarhynchos* and *L. luscinia*. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 59(2): 157–170. (IF: 0.263)

ÁCS Z. & KOVÁTS D. (2013): Phylogenetic patterns of a nightingale population in a contact zone of *Luscinia megarhynchos* and *L. luscinia* in Hungary. North-Western Journal of Zoology 9(2): 365–373. (IF: 0.7)

HORNOK S., KOVÁTS D., CSÖRGŐ T. *et al.* (2014): Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. Parasites & Vectors 7: 128. (IF: 3.43)

### 6.2. Az értekezés témakörében megjelent egyéb publikációk

KOVÁTS D. & HARNOS A. (2015): Morphological classification of conspecific birds from closely situated breeding areas – A case study of the Common Nightingale. Ornis Hungarica 23(2): 20–30.

KOVÁTS D. (2012): Autumn migration of the thrush nightingale (*Luscinia luscinia*) in Northern Hungary. The Ring 34(1): 23–36.

- KOVÁTS D., URBÁN H. & VARGA Z. (2009): Szimpatrikus övezetben költő fülemülék morfológiai összehasonlítása. *Állattani Közlemények* 94(1): 55–62.
- KOVÁTS D. & UDVARI ZS. (2009): Adatok a fülemüle (*Luscinia megarhynchos*, Brehm 1931) szimpatrikus övezetben történő postnuptiális vedléséhez. *Folia Historico Naturalia Musei Matraensis* 33: 241–248.
- KOVÁTS D. & URBÁN H. (2009): A Bódva-völgyben költő fülemülék (*Luscinia* spp.) taxonómiai problémája. *Folia Historico Naturalia Musei Matraensis* 33: 227–231.
- KOVÁTS D. & URBÁN H. (2009): A nagy fülemüle (*Luscinia luscinia*, Linnaeus 1758) őszi vonulása a Bódva-völgyben. *Folia Historico Naturalia Musei Matraensis* 33: 233–239.

### **6.3. Az értekezés témakörében elhangzott konferencia előadások és poszter-előadások**

- KOVÁTS D. & HARNOS A. (2014): Klasszifikációs tanuló algoritmusok használata populációk elkülönítésére: esettanulmány fülemülére. V. Kvantitatív Ökológiai Szimpózium, Tihany, 2014. május 9-10.
- KOVÁTS D. & URBÁN H. (2009): Morphological difference between nightingales in sympatric habitats in Hungary – The 1st. Forum Carpathicum. Krakow, Poland. Science for Carpathians. Integrating Nature and Society Toward Sustainability, 15-18. September 2010., 46 p.