



Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytetu Łódzkiego

Aleksandra Janiszewska

**Czynniki warunkujące występowanie
poliksenicznego ektopasożyta u ptaków
zasiedlających odmienne nisze ekologiczne**

Factors determining the occurrence of a polyxenous ectoparasite in
birds occupying different ecological niches

Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem promotora
dra hab. Macieja Bartosa, prof. UŁ
oraz promotora pomocniczego
dra Tomasza Rewicza

w Katedrze Badania Różnorodności Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji
Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska

Łódź 2025

Pragnę wyrazić głęboką wdzięczność
dr. hab. Maciejowi Bartosowi, prof. UŁ
oraz dr. Tomaszowi Rewiczowi

za wspólną pracę, opiekę merytoryczną i ogromną
cierpliwość okazaną podczas przygotowywania
niniejszej rozprawy doktorskiej.

Dziękuję także całemu zespołowi Katedry Badania
Różnorodności Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji, w
szczególności

prof. dr hab. Piotrowi Miniasowi

za poświęcony czas, cenne wskazówki oraz życzliwość,
które znacząco wzbogaciły moje badania.

Jestem wdzięczna również obrączkarzom i załogantom z
obozów Akcja Bałtycka, Bukówka, Carpatica, Družno,
Jeziorsko, Rakutowskie i Wisła za pomoc w zbieraniu
materiałów i danych bez których niniejsza praca nie
mogłaby powstać.

Z całego serca dziękuję swojej rodzinie oraz
przyjaciołom za niezmierną cierpliwość, wyrozumiałość
i dodawanie otuchy w chwilach trudnych. Wasze
wsparcie psychiczne i wiara w moje możliwości
pozwoliły mi dokończyć tę pracę.

Spis treści

1.	Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	4
2.	Streszczenie w języku polskim	5
3.	Streszczenie w języku angielskim	7
4.	Wprowadzenie	9
5.	Cele i hipotezy badawcze.....	11
5.1.	Rozdział I – Opracowanie nowego narzędzia molekularnego wykorzystywanego n.in. w ekologii molekularnej wplezczy z rodzaju <i>Ornithomya</i> (Hippoboscidae) (Artykuł 1).	11
5.2.	Rozdział II - Zróżnicowanie genetyczne poliksenicznego ektopasożyta <i>Ornithomya avicularia</i> (Hippoboscidae) i jego powiązania z gatunkiem żywiciela z wykorzystaniem sekwencji mikrosatelitarnych (Artykuł 2).....	11
5.3.	Rozdział III – Biologia gospodarzy warunkuje występowanie wplezczy u ptaków, które zasiedlają odmienne nisze ekologiczne (Artykuł 3).....	12
6.	Metody.....	12
6.1.	Opis gatunków	12
6.1.1.	Wplezcze.....	12
6.2.2.	Wybrane gatunki żywicielskie	16
6.2.	Obszar i materiał wykorzystany w badaniach	19
6.3.	Metody laboratoryjne	20
6.4.	Analiza statystyczna.....	21
6.4.1.	Rozdział I i II.....	21
6.4.2.	Rozdział III	22
7.	Wyniki i dyskusja	24
7.1.	Rozdział I	24
7.2.	Rozdział II.....	25
7.3.	Rozdział III	27
8.	Podsumowanie i wnioski	30
9.	Literatura	32
10.	Dorobek naukowy	38
11.	Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	39
	Rozdział I	39
	Rozdział II.....	46
	Rozdział III.....	54
12.	Oświadczenia współautorów prac	87

1. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Rozdział I

Janiszewska A, Bartos M, Trębicki Ł, Remisiewicz M, Cierlik G, Minias P, Rewicz T. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies. *Experimental Parasitology* 2023; 255: 108652.

Impact Factor: 1.4; Punkty MNiSW: 100

Rozdział II

Janiszewska A, Rewicz T, Minias P, Włodarczyk W, Kamiński M, Fiutek P, Jakubas D, Rapczyński J, Remisiewicz M, Sztwiernia H, Bartos M. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 2025; 27: 101081

Impact Factor: 2.0; Punkty MNiSW: 100

Rozdział III

Janiszewska, A., Minias, P., Włodarczyk, R. , Kamiński, M., Jakubas, D., Remisiewicz, M., Sztwiernia, J. Bartos, M. Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds. *Oikos* (w recenzji)

Impact Factor: 3.0; Punkty MNiSW: 100

2. Streszczenie w języku polskim

Relacja żywiciel-pasożyt stanowi jeden z fundamentalnych mechanizmów kształtujących strukturę i funkcjonowanie układów biologicznych. Pasożytnictwo, jako forma interakcji antagonistycznej, wpływa nie tylko na kondycję i biologię gospodarza, ale również wywołuje istotne konsekwencje ewolucyjne i ekologiczne po obu stronach tej zależności. W przypadku pasożytów poliksenicznych, takich jak wpleszcze z rodzaju *Ornithomya*, które mogą wykorzystywać wielu gospodarzy należących do różnych grup ekologicznych, szczególnie interesujące jest zrozumienie, jakie czynniki determinują ich obecność u konkretnych gatunków ptaków. Zmienność w częstotliwości pasożytowania może wynikać z różnic w ekologii gospodarzy, obejmujących m.in. preferencje siedliskowe, strategie rozrodu, sposoby żerowania, wzorce migracyjne oraz czynniki klimatyczne.

Rozprawa doktorska dotyczy genetycznych i ekologicznych uwarunkowań pasożytnictwa krajowych wpleszczowatych (Hippoboscidae, Diptera) zwanych także wpleszczami na ptakach w okresie migracji jesiennej. Badania koncentrowały się na analizie zróżnicowania genetycznego w zależności od gatunku żywiciela oraz czynników wpływających na ich występowanie u ptaków zasiedlających różne nisze ekologiczne.

W Rozdziale I przedstawiono opracowane narzędzie molekularne, tj. zestaw markerów mikrosatelitarnych, do analizy struktury populacyjnej wpleszczy. Owady te wciąż pozostają słabo poznaną grupą zwierząt, a tym samym brak jest wystarczającej ilości narzędzi molekularnych, które byłyby pomocne w przypadku badań skupiających się na ekologii molekularnej tych zwierząt. Na początku badań opracowaliśmy zestaw 20 polimorficznych markerów dedykowanych bezpośrednio wpleszczom z rodzaju *Ornithomya* wykorzystując sekwencjonowanie Illumina Mi-seq.

Rozdział II opisuje wykorzystanie tego narzędzia do zbadania, czy genetyczne zróżnicowanie poliksenicznego gatunku wpleszcza *Ornithomya avicularia* odpowiada preferencjom siedliskowym jego gospodarzy. Mimo różnic ekologicznych i filogenetycznych między ptakami, wykazano niski poziom różnicowania genetycznego *O. avicularia*, co wskazuje na silny przepływ genów pomiędzy populacjami pasożytów związanymi z różnymi żywicielami.

Rozdział III analizuje czynniki warunkujące obecność wpleszczy u 157 gatunków ptaków w trakcie jesiennej migracji. Wykazano, że masa ciała żywiciela, średnie opady na

terenach lęgowych, rodzaj siedliska, nisza troficzna oraz dystans migracji wpływają na prewalencję wpleszczy. Dwa najpospolitsze gatunki pasożytów uwzględnione w analizach wykazywały odmienne preferencje żywicielskie - *O. fringillina* częściej występowała u ptaków o małej masie ciała, a rzadziej u dalekich migrantów, natomiast *O. avicularia* u gatunków o wyższej masie ciała, u których dystans migracyjny żywicieli nie wpływał istotnie na obecność tego gatunku.

Praca rzuca nowe światło na interakcje pasożyt-żywiciel, wskazując na złożone zależności ekologiczne i umiarkowaną specjalizację względem gospodarza. Jednocześnie opracowane narzędzie molekularne stanowi istotny wkład w dalsze badania nad molekularną ekologią wpleszczy.

3. Streszczenie w języku angielskim

The host-parasite relationship is one of the fundamental mechanisms shaping the structure and functioning of biological systems. Parasitism, as a form of antagonistic interaction, affects not only the condition and biology of the host but also exerts significant evolutionary and ecological consequences for both sides of this association. In the case of polyxenous parasites, such as louse flies of the genus *Ornithomya*, which can exploit multiple hosts belonging to different ecological groups, it is particularly interesting to understand what factors determine their presence on specific bird species. Variation in infestation frequency may result from differences in host ecology, such as habitat preferences, breeding strategies, foraging behaviour, migration, or climatic factors.

The doctoral dissertation focuses on the genetic and ecological determinants of parasitism by native to Poland louse flies (Hippoboscidae, Diptera) on birds during autumn migration. The research focused on analysing the genetic diversity of these parasites in relation to host species and on identifying factors influencing their occurrence in birds occupying different ecological niches.

Chapter I presents the development of a molecular tool, a set of microsatellite markers, for analysing population structure in louse flies. These insects remain a poorly studied group of animals, and there is a lack of sufficient molecular tools that would facilitate studies focusing on their molecular ecology. To fill this gap, we developed a set of 20 polymorphic markers specifically designed for *Ornithomya* louse flies using Illumina MiSeq sequencing.

Chapter II describes the use of this tool to investigate whether the genetic differentiation of the polyxenous species *Ornithomya avicularia* reflects the habitat preferences of its hosts. Despite ecological and phylogenetic differences among birds, a low level of genetic structuring was detected in *O. avicularia*, indicating strong gene flow between parasite populations associated with different hosts.

Chapter III analyses the factors determining the presence of louse flies on 157 bird species during autumn migration. The results showed that host body mass, mean precipitation in breeding areas, habitat type, trophic niche, and migration distance influence the prevalence of avian louse flies. The two most common parasite species included in the analyses exhibited different host preferences: *O. fringillina* occurred more frequently on birds with small body mass and less often on long-distance migrants, whereas *O. avicularia* was more common on

species with higher body mass, and the migration distance of hosts did not significantly affect the occurrence of this species.

The research sheds new light on host-parasite interactions, revealing complex ecological relationships and moderate host specialization. The molecular tool developed here represents an important contribution to further studies on the molecular ecology of louse flies.

4. Wprowadzenie

Jednym z mechanizmów, które odgrywają kluczową rolę w ewolucji organizmów oraz kształtują strukturę ekosystemów jest układ żywiciel-pasożyt. Pasożytnictwo, jako forma interakcji antagonistycznej, wpływa na morfologię, fizjologię oraz zachowania zarówno jednej jak i drugiej strony. Ta specyficzna zależność, w której jeden organizm (pasożyt) czerpie korzyści kosztem drugiego (żywiciela), prowadzi do złożonych procesów adaptacyjnych (Buckingham i Ashby, 2021).

Ewolucyjny rozwój mechanizmów obronnych u żywicieli oraz strategii ich omijania przez pasożyty prowadzi do koewolucji, w której zmiany genetyczne zachodzą w wyniku doboru naturalnego i są efektem wzajemnego oddziaływania tych dwóch organizmów. W odróżnieniu od ewolucji jednostronnej, czyli procesu, w którym zmiany adaptacyjne wywołane presją selekcyjną bądź warunkami środowiskowymi występują tylko na poziomie jednej linii organizmów, koewolucja jest efektem wzajemnego adaptowania się przynajmniej dwóch gatunków wywierających na siebie bezpośrednio wpływ selekcyjny. Na poziomie relacji żywiciel-pasożyt, ewolucja jednej ze stron prowadzi do zmiany presji selekcyjnej oraz odpowiedzi adaptacyjnej drugiej strony (Thompson, 2005). Proces ten prowadzi często do powstawania wyspecjalizowanych cech. Dobór naturalny może faworyzować geny unikania u pasożyta w odpowiedzi na reakcję immunologiczną gospodarza, u którego może nastąpić rozwój genów odporności. Zjawisko to często określane jest w literaturze jako wyścig zbrojeń (ang. *arms race*), w którym strategia ataku i obrony jest sukcesywnie wzmacniana lub też opiera się na cyklicznych zmianach częstości alleli w populacjach, jak w modelu Czerwonej Królowej (Decaestecker i in., 2007).

Model wyścigu zbrojeń przypomina liniowy proces eskalacji, w którym żywiele rozwijają mechanizmy obronne w odpowiedzi na co pasożyty reagują strategiami przełamania bądź unikania tych mechanizmów (Dawkins i Krebs, 1979). Ze względu na bardzo wysoki poziom antagonizmu relacja pomiędzy pasożytami, a ich żywicielami stanowi szczególnie wyraźny przykład interakcji koewolucyjnej. Żywiciel rozwija rozmaite mechanizmy obronne na poziomie behawioralnym oraz immunologicznym, umożliwiające ograniczenie szkód wywołanych przez pasożyta, który rozwija strategie omijające te mechanizmy (Woolhouse i in., 2002; Schmid-Hempel, 2011).

Silne sprzężenie zwrotne występujące w tej relacji sprzyja zmianom genetycznym szczególnie widocznym w populacjach pasożytów, co związane jest między innymi z wysoką liczbą produkowanego potomstwa oraz szybszego tempa mutacji (Ebert, 1998). Dzięki temu

pasożyty są w stanie szybciej opowiadać na zmiany zachodzące w populacjach żywicielskich stawiając je w permanentnej presji, która napędza kolejne adaptacje (Gandon i Michalakis, 2000).

Pasożyty wykształciły szereg mechanizmów, które umożliwiają skuteczne unikanie obrony immunologicznej żywiciela. Jednym z lepiej poznanych mechanizmów tego rodzaju jest zdolność do zmieniania struktur powierzchniowych, które są rozpoznawane przez układ odpornościowy gospodarza (tzw. zmienność antygenowa). Zmienność antygenową możemy obserwować m.in. u zarodźca sierpowatego *Plasmodium falciparum* wywołującego malarię czy świdrowca nagany *Trypanosoma brucei*, które są w stanie unikać odpowiedzi immunologicznej żywiciela, co umożliwia pozostanie w jego organizmie przez dłuższy czas (Deitsch i in., 2009; Schmid-Hempel, 2011). Innym przykładem przystosowań, które umożliwiają skuteczne wnikanie do organizmu żywiciela są fizjologiczne mechanizmy penetracji tkanek czy molekularne systemy, które maskują obecność pasożyta. Częstym zjawiskiem zwiększającym skuteczność infekcji jest synchronizacja z procesami fizjologicznymi i zachowaniem żywiciela. Obejmuje to wieloetapowe cykle, które obejmują różne stadia rozwojowe, a także angażują kilku żywicieli pośrednich. Przykładem mogą być tu zarodźce *Plasmodium* spp. oraz przywry z rodzaju *Schistosoma* (Combes, 2001).

Żywiciele nie pozostają bierni w tym układzie wykształcając mechanizmy obronne mające na celu eliminację pasożytów, ograniczanie ich infekcji czy kontrolę nad ich namnażaniem się. Kluczową rolę odgrywa układ odpornościowy żywiciela, zarówno jego wrodzona jak i nabyta część, która opiera się m.in. na limfocytach T i przeciwciałach (Janeway i in., 2017). Poza mechanizmami immunologicznymi wiele gatunków wykształciło behawioralne formy ochrony takie jak zachowania komfortowe (wszelkie aktywności zwierząt, które służą utrzymaniu higieny ciała, takie jak drapanie, lizanie, kąpiele piaskowe bądź iskanie) lub unikanie siedlisk, które mogą zwiększać ryzyko infekcji (Hart, 1990). Biorąc pod uwagę poziom populacyjny istotnym czynnikiem, który wpływa na odporność przeciw pasożytniczą jest zmienność genetyczna. Szczególną rolę u kręgowców odgrywają geny głównego układu zgodności tkankowej (MHC), które mają zdolność rozpoznawania szerokiego wachlarza antygenów pochodzenia pasożytniczego. Zmienność w ich obrębie jest zwykle utrzymywana dzięki presji wywieranej przez pasożyty (Spurgin i Richardson, 2010).

5. Cele i hipotezy badawcze

5.1. Rozdział I – Opracowanie nowego narzędzia molekularnego wykorzystywanego n.in. w ekologii molekularnej wpleszczy z rodzaju *Ornithomya* (Hippoboscidae) (Artykuł 1).

Celem pracy było opracowanie zestawu markerów mikrosatelitarnych dedykowanych wpleszczom z rodzaju *Ornithomya*. Grupa tych zwierząt, pomimo istotnego znaczenia ekologicznego i epidemiologicznego, pozostaje wciąż słabo poznana, a dotychczasowe możliwości analizy ich zmienności genetycznej są ograniczone ze względu na brak odpowiednich narzędzi molekularnych. Zastosowanie technologii sekwencjonowania nowej generacji (Illumina MiSeq) umożliwiło identyfikację oraz selekcję 20 polimorficznych markerów, które mogą zostać wykorzystane w badaniach nad strukturą populacji, różnorodnością genetyczną i dynamiką przepływu genów u tych pasożytów. Ostatecznym celem było stworzenie metody dla przyszłych badań z zakresu ekologii molekularnej wpleszczy, co pozwala m.in. lepiej poznać biologię, strategie adaptacyjne oraz potencjalną rolę w transmisji wpleszczy.

5.2. Rozdział II - Zróżnicowanie genetyczne poliksenicznego ektopasożyta *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae) i jego powiązania z gatunkiem żywiciela z wykorzystaniem sekwencji mikrosatelitarnych (Artykuł 2).

Celem pracy było zbadanie struktury genetycznej oraz stopnia zróżnicowania w populacji wpleszcza *Ornithomya avicularia*, w zależności od jego gospodarzy. W pracy staraliśmy się odpowiedzieć na pytanie, czy wzorce różnicowania genetycznego tego pasożyta odzwierciedlają filogenetyczne lub ekologiczne zróżnicowanie ptasich gospodarzy.

W artykule podjęto się weryfikacji hipotezy, która zakłada, że pasożyty zasiedlające gospodarzy o zbliżonych preferencjach siedliskowych będą genetycznie bardziej podobne do siebie, niezależnie od ich filogenezy. Badania były przeprowadzone na *O. avicularia* zebranych z czterech grup ptaków: kszczyka *Gallinago gallinago* (ptaka siewkowego preferującego tereny podmokłe), uszatki zwyczajnej *Asio otus* (gatunku drapieżnego zasiedlającego tereny leśne), kosa *Turdus merula* (drozda preferującego siedliska o charakterze leśnym) oraz trzciniaaka *Acrocephalus arundinaceus* i trzcinniczka *A. scirpaceus* (dwóch blisko spokrewnionych gatunków związanych z trzcinowiskami).

5.3. Rozdział III – Biologia gospodarzy warunkuje występowanie wpleszczy u ptaków, które zasiedlają odmienne nisze ekologiczne (Artykuł 3)

W trzecim artykule starałam się odpowiedzieć na pytanie, które z aspektów biologii gospodarzy wpływają na obecność wpleszczy. Dane wykorzystane w analizach zostały zgromadzone w okresie dekady 2014-2023 na pięciu punktach obrączkarskich zlokalizowanych w różnych częściach Polski. W analizach wykorzystano wielowymiarowe uogólnione liniowe modele mieszane (MCMCglmm). Analizy były prowadzone w oparciu o dane zebrane z 157 gatunków ptaków odławianych podczas jesiennej migracji. Aby zidentyfikować cechy gospodarzy kształtujące międzygatunkowe zróżnicowanie prewalencji wpleszczy wykonano analizę porównawczą uwzględniającą filogenezę ptaków. W całej próbie zostało zidentyfikowanych siedem gatunków wpleszczy. W tym zestawieniu dominowały dwa gatunki: *O. avicularia* i *O. fringillina*.

Dzięki wykorzystaniu modeli bayesowskich wykazaliśmy, że całkowita prewalencja wpleszczy była istotnie związana z masą ciała gospodarza, roczną wartością opadów na terenach łęgowych, typem siedliska, niszą troficzną oraz jego dystansem migracyjnym. W przypadku *O. avicularia* i *O. fringillina* wykazaliśmy, że odmienne cechy gospodarzy wpływają istotnie na obecność poszczególnych gatunków pasożytów.

6. Metody

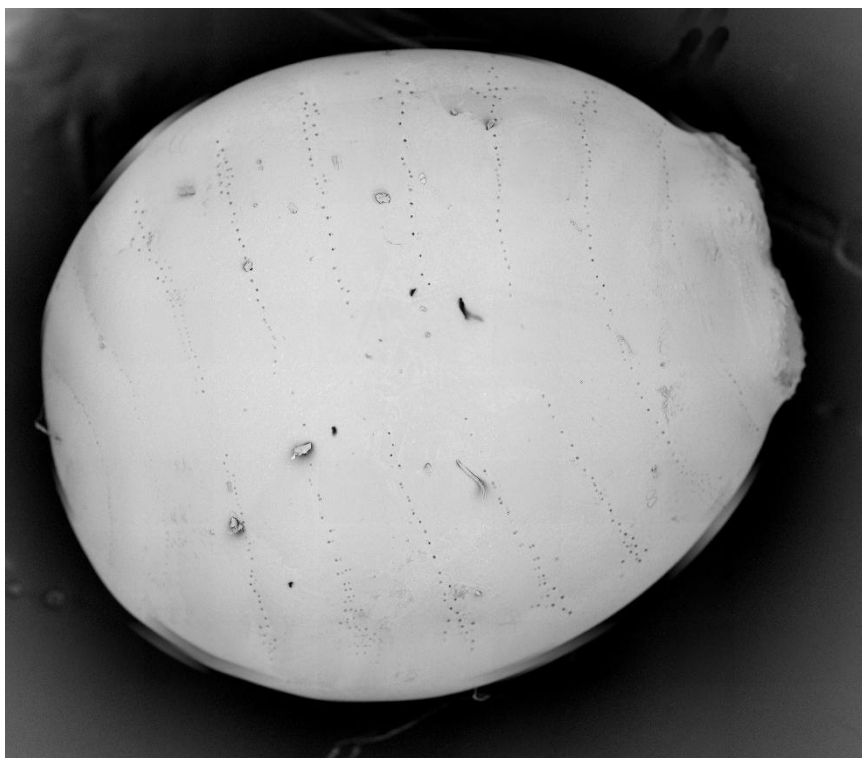
6.1. Opis gatunków

6.1.1. Wpleszcze

Wpleszczowate (Diptera: Hippoboscidae) są hematofagicznymi ektopasożytami zwierząt stałocieplnych. W momencie pisania rozprawy poznano 213 gatunków, z czego większość jest pasożytami ptaków. Podrodzina *Ornithomyinae* skupia gatunki pasożytujące na ptakach (171 gatunków), *Lipopteninae* są powiązane ze ssakami (34 gatunki), natomiast gatunki zaklasyfikowane do *Hippoboscinae* to generaliści występujący zarówno na ptakach jak i ssakach (Dick, 2006).

Charakterystycznym elementem biologii tej grupy jest larworodność, ciekawe zjawisko polegające na tym, że okres larwalny ma miejsce w ciele matki. Po jej opuszczeniu od razu rozpoczyna się okres poczwarkowy ze specyficznym typem poczwarki, tzw. pupparium (Ryc. 1). Transmisja ptasich wpleszczy następuje najczęściej w gnieździe, gdzie pupparia zazwyczaj zimują. Po metamorfozie przypadającej na okres wiosenny stadium imaginalne

wpleszczy atakuje dorosłe ptaki i ich pisklęta. Dorosły etap życia tych pasożytów ma miejsce wśród piór i na powierzchni skóry ich gospodarza.



Ryc. 1 Pupprium *Ornithomya avicularia* (fot. M. Bartos)

Badania wykazały różną przeżywalność puppariów wpleszczy w zależności od warunków środowiskowych, w których przebywają. Niewątpliwie, istotnym czynnikiem jest temperatura. W przypadku *Lipoptena cervi* - pospolitego wpleszcza związanego przede wszystkim ze ssakami kopytnymi, wykazano, że poczwarki w okresie tzw. diapauzy zimowej zamarzają w temperaturze -26°C , natomiast optymalnymi warunkami do rozwoju w okresie zimy jest zakres temperatur od -20°C do -21°C (Harkonen i in., 2012). W przypadku puppariów *Pseudolynchia canariensis*, gatunku wpleszcza pasożytującego na dzikich gatunkach gołębi, występującego w strefach zwrotnikowych i podzwrotnikowych, temperatury poniżej 13°C i wyższe niż 37°C są dla nich śmiertelne, a optymalnym zakresem, który maksymalizował przeżywalność puppariów były temperatury od $24,6^{\circ}\text{C}$ do 30°C (Klei i Degiusti, 1975). *Crataerina pallida* to gatunek związany z jerzykami *Apus apus*, którego pupparia wykluwają się w gniazdach żywicieli. Walker i Rotherham (2010) donoszą, że najbardziej optymalnymi temperaturami dla wylęgu poczwarek tego gatunku jest zakres $27-36^{\circ}\text{C}$, co pokrywa się to z warunkami termicznymi, które panują w gniazdach jerzyków.

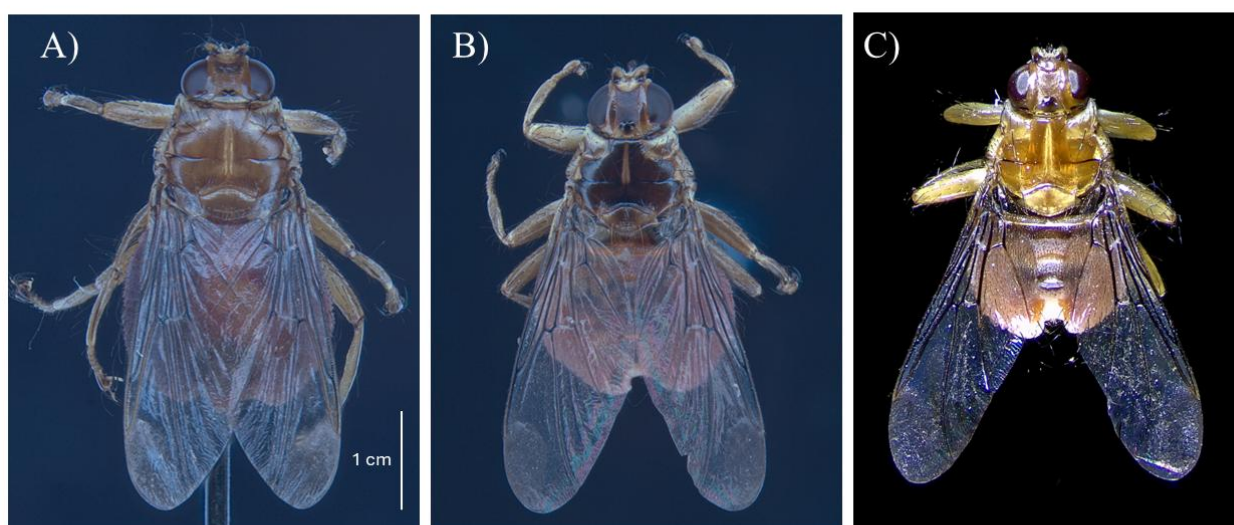
Wiele gatunków wpleszczy wykazuje różne stopnie specyficzności co do wyboru gospodarza. Dla przykładu, *O. avicularia* jest jednym z najpospolitszych wpleszczy pasożytujących na różnych gatunkach ptaków na obszarze Palearktyki (Obona i in. 2019), podczas gdy *Melophagus ovinus* jest monoksenicznym pasożytem owiec (Liu i in., 2016; Boucheikhchoukh i in. 2019). Ptasie gatunki wpleszczy mogą aktywnie zmieniać swoich żywicieli, ale ma to miejsce głównie w warunkach, w których ich żywiciele tworzą większe ugrupowania, np. w miejscach wspólnego żerowania, noclegowiskach lub miejscach postojowych w okresie migracji (Santolíkova i in. 2022; Keve i in. 2024). Dodatkowym elementem wpływającym na większe zdolności rozprzestrzeniania się są stosunkowo dobrze rozwinięte skrzydła, których część wpleszczy pasożytujących na ptakach nie odrzuca nawet po znalezieniu żywiciela, w przeciwieństwie do gatunków związanych ze ssakami (Yatsuk et al. 2023).

Poza utratą krwi oraz wywoływaniem infekcji wpleszcze mają znaczący wpływ na zdrowie swoich gospodarzy. Wiadomo, że wpleszcze są wektorami patogenów przenoszonych przez krew, takich jak *Trypanosoma melofagium* (Pfeiffer, 1905), *Megatrypanum trypanosomes* (Bose i Petersen, 1991) i *Bartonella* spp. (Bartosik i in., 2021). Dla kilku gatunków *Trypanosoma*, *Acanthocheilonema*, *Anaplasma fagocytofilum* i *Borrelia burgdorferi* wektorem zwiększającym ich rozprzestrzenianie jest *Lipoptena cervi* (Buss i in., 2016; Werszko i in., 2020) lub *Hippobosca longipennis* (Burakova, 1998; Rani i in. 2011). Istnieje również kilka doniesień o przenoszeniu *Bartonella* spp. przez *Lipoptena cervi* (Szewczyk i in., 2017; Regier i in., 2018; Pena-Espinoza i in., 2023).

Wpleszcze pasożytujące na ptakach również uznawane są za wektory patogenów, ale w tym kontekście wciąż jest to grupa niedostatecznie zbadana. Baker (1967) donosi, że *O. avicularia* jest wektorem *Trypanosoma avium*, a wirus Zachodniego Nilu wykryto u *Icosta americana* zebranych z ptaków drapieżnych (Farajollahi i in. 2005). Obecność *Babesia* spp., *Wolbachia* spp. oraz *Trypanosoma corvi* potwierdzono u *O. avicularia* i *O. biloba* (Čisovská Bazsalovicsová i in. 2023). Wpleszcze pasożytujące na ptakach klasyfikowanych jako długodystansowi migranci mogą być przenoszone na znaczne odległości, co ułatwia rozprzestrzenianie się patogenów w szerszej skali geograficznej (Bartos i in., 2020).

Biorąc pod uwagę dużą różnorodność wpleszczy, ich bezpośredni wpływ na gospodarzy oraz aspekt epidemiologiczny zaskakuje fakt, że wiedza na ich temat jest wciąż dość fragmentaryczna. W przypadku badań molekularnych owady te nie są częstym obiektem analiz. Do tej pory w badaniach nad tą grupą wykorzystano barkoding DNA (fragment Oksydazy

Cytochromowej I (COI) z mitochondrialnego DNA) do identyfikacji takich gatunków, jak *Icosta americana*, *Ornithomya anchineuria*, *O. avicularia*, *O. bequaerti*, *O. metallica*, *O. fringillina*, *Ornithophila gestroi*, *Crataerina hirundinis* i *C. pallida* (Gutiérrez-López i in., 2015; Lehtikoinen i in., 2021; Levesque-Beaudin i Sinclair, 2021). Niektóre z tych badań dotyczyły porównawczej filogeografii zarówno samych pasożytów, jak i ich gospodarzy. Zastosowanie jądrowych markerów molekularnych, takich jak mikrosatelity, u wpleszczy jest jeszcze słabiej reprezentowane w doniesieniach naukowych. Van Schaik i inni (2018) opracowali markery mikrosatelitarne, które można wykorzystać do porównania struktury populacyjnej *Basilina nana* należącej do Hippoboscoidea.



Ryc. 2 Wybrane wpleszcze z rodzaju *Ornithomya* A) *O. avicularia*, B) *O. chloropus*, C) *O. fringillina*; skala = 1 cm (fot. M. Bartos)

Gatunkiem modelowym w moich badaniach jest *Ornithomya avicularia* (Ryc. 2A), wpleszcz należący do najbardziej pospolitych europejskich gatunków, pasożytujący na co najmniej 65 taksonach ptaków (Maa, 1969). Podobnie jak inne gatunki z rodzaju *Ornithomya* posiada dobrze rozwinięte skrzydła, których nie odrzuca przez całe życie, co umożliwia rozprzestrzenianie się pomiędzy żywicielami (Borowiec, 1984). Gatunek ten, podobnie jak inne wpleszcze, rozmnaża się przy pomocy larworodności. Metamorfoza do stadium imagalnego trwa 20-50 dni (Hutson, 1984). W warunkach niskich temperatur w okresie zimowym stadium poczwarki może trwać nawet do 10 miesięcy (Baker, 1967). Gatunek ten najczęściej występuje na terenach nizinnych z bardziej zwartą roślinnością (Hutson, 1984).

Wśród gatunków, najliczniej reprezentowanych w analizach wymieni ć należy także *Ornithomya fringillina* (Ryc. 2C). Ten gatunek spotykany był najczęściej na ptakach wróblowych, ale jego gospodarzami bywają również przedstawiciele rodziny jastrzębiowatych, jaskółkowatych, czy ptaki z rzędu sów (Maa, 1969). Związany jest z nizinnymi terenami o charakterze leśnym i bagiennym porośniętymi gęstą roślinnością (Hutson, 1984). Okres rozwoju pupparium to około 270-300 dni w okresie zimowym (Borowiec, 1984).

Ornithomya chloropus (Ryc. 2B) jest pospolitym wpleszczem pasożytującym przede wszystkim na małych ptakach wróblowych, ale ten pasożyt odnotowywany był również na sokołach, siewkach, chruścielach, czy kukułkach. W przeciwieństwie do *O. fringillina* gatunek ten preferuje siedliska otwarte, często wyżynne, bez zwartej warstwy roślinności (Hutson, 1984). W warunkach laboratoryjnych rozwój zimującego pupparium zajmuje około 370 dni (Borowiec, 1984).

6.2.2. Wybrane gatunki żywicielskie

Kszyk *Gallinago gallinago* jest przedstawicielem bekasowatych związanym z terenami o charakterze wodno-błotnym. Spotykany jest na obszarach podmokłych z wodą słodką oraz wodami słonawymi, w tym na podmokłych łąkach, turzycowiskach, a w północnych obszarach zasięgu w Europie zajmuje podmokłe tereny tundry i obszary leśne. W diecie znajdziemy przede wszystkim różne bezkręgowce z niewielkim udziałem nasion i włókien roślinnych zbieranych w trakcie sondowania podłoża. Okres lęgowy od kwietnia do czerwca (del Hoyo i in., 1994). Ptaki gniazdujące na terenie północno-wschodniej Europy w okresie jesiennej migracji wędrują przez kraje bałtyckie na zimowiska w zachodniej Europie, podczas gdy ptaki z terenów lęgowych znajdujących się nieco bardziej na południu wybierają trasę wiodącą przez środkową Europę aż do basenu Morza Śródziemnego i północno-zachodniego wybrzeża Afryki (Minias i in., 2010).

Uszatka zwyczajna *Asio otus* to gatunek sowy z rodziny puszczykowatych. W okresie lęgowym związana jest z terenami o charakterze leśnym z gęstą roślinnością, często w sąsiedztwie terenów otwartych takich jak łąki czy pola uprawne. Gniazduje również na otwartych obszarach leśnych. Zimą zajmuje podobne siedliska. W diecie przede wszystkim znajdują się drobne gryzonie, z niewielkim udziałem drobnych ptaków. W okresie lęgowym zaczyna polować o zmierzchu aż do późnej nocy. Zwykle jest gatunkiem osiadłym, choć ptakom z północnej części zasięgu oraz młodym zdarza się podejmować wędrówkę. Zwyczaje wędrówkowe tego gatunku wciąż pozostają stosunkowo słabo poznane (del Hoyo i in., 1994).

Trzcinniczek *Acrocephalus scirpaceus* związany jest z szerokim pasem szuwarowym ulokowanym nad brzegami jezior, stawów, rzek i rowów. Żeruje w wyższych partiach drzew, takich jak wierzby, na roślinności szuwarowej, rzadko na ziemi, poszukując drobnych bezkręgowców. Dieta okresowo uzupełniana jest o nasiona, owoce i kwiaty. W zachodniej i środkowej Europie sezon lęgowy rozpoczyna się w maju, a kończy na przełomie lipca i sierpnia. Trzcinniczek jest dalekim migrantem, którego tereny zimowisk obejmują środkową Afrykę. Gatunek wykazuje dużą zmienność jeśli chodzi o trasy migracyjne, które są zależne od obszaru lęgowego. Ptaki ze środkowej Europy zimują na obszarze na wschód od Senegambii po Zatokę Gwinejską. Osobniki z Europy Środkowej kierują się w różnych kierunkach: ptaki z rejonu Bałtyku i Morza Wattowego migrują na południowy zachód, natomiast te gniazdujące w obszarze Półwyspu Bałkańskiego, na południowy wschód. Trzcinniczki z Europy Wschodniej przemieszczają się głównie na południowy wschód, choć część może migrować również na południowy zachód, o czym świadczą obserwacje przelotów przez Adriatyk w kierunku Hiszpanii. Trasy migracyjne wykazują więc wyraźne zróżnicowanie geograficzne i niejednorodność kierunków przelotu (Procházka i in. 2008).

Trzciniak *Acrocephalus arundinaceus* występuje również w trzciniowiskach i szuwarach, bardzo często z przewagą pałki wodnej, w wodzie słodkiej i słonawej. Rzadko kiedy jednak wybiera zbiorowiska wierzbowe. Preferuje roślinność trzcinową o grubych łodygach w pobliżu otwartej wody. Dieta bazuje przede wszystkim na owadach i pajęczakach, czasem uzupełniana jest o małe ślimaki, a poza sezonem lęgowym o owoce i jagody. Żeruje przeszukując liście i łodygi. Niektóre z ofiar łapane są w powietrzu, czasem też zbierane są z powierzchni wody. Okres lęgowy przypada od połowy maja do początku lipca. Obszar zimowisk obejmuje teren od południowej części subsaharyjskiej Afryki po południe tego kontynentu (del Hoyo i in., 1994). Trzciniaki z Zachodniej Europy lecą przez Półwysep Iberyjski, a następnie północno-zachodnią Afrykę, natomiast osobniki z obszaru środkowej i północnej Europy (Skandynawia) przemieszczają się wzdłuż środkowej części Morza Śródziemnego. Ptaki z północno-wschodniej i wschodniej Europy migrują przez teren Bałkanów. taki zachowują w dużej mierze długość geograficzną miejsc lęgowych także na trasach migracyjnych i zimowiskach (Koleček i in. 2016).



Rycina 3 Wybrani żywiciele *Ornithomya avicularia* (fot. A. Janiszewska)

Kos *Turdus merula* jest gatunkiem pierwotnie związanym z gęstymi lasami o bogatym podszyciu. Obecnie zajmuje różnorodne siedliska od terenów górskich po obszary miejskie z preferencją tych z dogodnymi miejscami do żerowania i gniazdowania (tj. roślinność z owocami jagodowymi oraz rozrośniętymi krzewami). Dieta jest zróżnicowana i zależna od pory roku. W okresie wiosenno-letnim gatunek bazuje przede wszystkim na różnych gatunkach bezkręgowców z preferencją chrząszczy oraz pierścienic. W okresie jesienno-zimowym kosi odżywiają się różnymi rodzajami owoców oraz nasionami traw. Żeruje zwykle na ziemi, przeszukując ściółkę. Okres lęgowy w Europie przypada od marca do lipca, wyprowadza nawet trzy lęgi w okresie jednego sezonu. Gatunek jest raczej osiadły, częściowo migrują ptaki z populacji północnych. Przelot rozpoczyna się pod koniec września, ze szczytem przypadającym na okres od października do początku listopada. Migrują przede wszystkim samice oraz młode ptaki (del Hoyo i in., 1994). Osobniki gniazdujące na terenie Fennoskandii oraz Danii kierują się na północny zachód, większość z nich zimuje na terenie Wielkiej Brytanii, Holandii i Irlandii, niektóre docierają w rejony Hiszpanii oraz północnych Włoch. Osobniki gniazdujące na terenie Wielkiej Brytanii zimują w Holandii, Irlandii, Francji oraz północnej Hiszpanii. Ptaki z Europy Środkowej migrują głównie w kierunku południowego zachodu kontynentu zimują przede wszystkim w południowej Francji, Szwajcarii i we Włoszech, ale także w innych

częściach Europy Zachodniej, w Wielkiej Brytanii, Hiszpanii i na zachodnich wyspach Morza Śródziemnego. Nieliczne osobniki docierają do północnej Afryki i Grecji. Kosy gniazdujące w Europie Wschodniej przemieszczają się w podobnym kierunku (NE-SW), zimując głównie w Wielkiej Brytanii oraz w zachodniej i południowej Europie. Znacznie rzadziej spotykane są w Grecji i Syrii (Spina i in. 2022).

6.2. Obszar i materiał wykorzystany w badaniach

Prace terenowe były prowadzone w trakcie jesiennej migracji ptaków w latach 2011-2023. Ptaki były odławiane w trakcie trwania obozów ornitologicznych odbywających się na terenie całej Polski. W pracach badawczych uwzględniono wpleszcze odłowione na obozach Akcja Bałtycka (punkty obrączkarskie znajdujące się na Mierzei Wiślanej $54^{\circ}21'55.98''\text{N}$; $19^{\circ}23'24.972''\text{E}$ i Bukowie $54^{\circ}20'15''\text{N}$, $16^{\circ}14'39.984''\text{E}$), Druzno ($54^{\circ}3'54.468''\text{N}$, $19^{\circ}27'52.091''\text{E}$), Rakutowskie ($52^{\circ}32'18.996''\text{N}$; $19^{\circ}15'2,592''\text{E}$), Jeziorsko ($51^{\circ}46'17.58''\text{N}$, $18^{\circ}40'23.556''\text{E}$; $51^{\circ}44'24.18''\text{N}$, $18^{\circ}39'57.779''\text{E}$), Obóz Wisła ($51^{\circ}58'20.172''\text{N}$; $21^{\circ}15'47.268''\text{E}$), Bukówka ($50^{\circ}42'26.28''\text{N}$; $15^{\circ}55'54.299''\text{E}$) i Carpatica ($49^{\circ}30'15.40''\text{N}$; $21^{\circ}25'28.90''\text{E}$) (Ryc. 5). Ptaki złapane w sieci ornitologiczne i pułapki tunelowe były sprawdzane pod kątem posiadanych pasożytów.



Ryc. 4 Mapa przedstawiająca miejsca chwywania wpleszczy.

Odłowione wpleszcze były chwywane ręcznie metodą na upatrzonego, a następnie konserwowane w 96% etanolu w temperaturze pokojowej aż do przeprowadzenia prac laboratoryjnych. Do oznaczania wszystkich złapanych wpleszczy wykorzystano klucz autorstwa Borowca (1984). Dodatkowo, u większości osobników użytych w analizach molekularnych przeprowadzono barkoding DNA w celu potwierdzenia identyfikacji morfologicznej. Dane dotyczące okazów referencyjnych, klasyfikacja taksonomiczna oraz sekwencje COI są publicznie dostępne w zbiorze danych DS-AJHIPP (DOI: <https://doi.org/10.5883/DS-AJHIPP>) w bazie BOLD (www.boldsystems.org) (Ratnasingham i Hebert, 2007).

6.3. Metody laboratoryjne

Izolacja DNA była przeprowadzona z wykorzystaniem odnóży kroczych wpleszczy (od każdego osobnika pobierano 2-3 nogi) oraz zestawu Bio-Trace DNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland). Wykorzystano protokół zgodny z zaleceniami producenta z niewielkimi modyfikacjami na etapie inkubowania tkanek, który wynosił 72 godziny.

W celu opracowania zestawu markerów mikrosatelitarnych dla wpleszczy z rodzaju *Ornithomya* wykonano sekwencjonowanie genomowe. Materiał genetyczny pochodził od jednego, losowo wybranego osobnika z gatunku *O. avicularia*, z którego wyizolowano DNA, a następnie przygotowano biblioteki sekwencyjne z krótkimi insertami (~350 pz) z wykorzystaniem NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina. Sekwencjonowanie było przeprowadzone przy pomocy platformy Illumina MiSeq (odczyt par końcowych 2x250 pz). Następnie, dane zostały poddane czyszczeniu przy pomocy programu Cutadapt ver. 1.16 (Martin, 2011). Wykrycie powtórzeń mikrosatelitarnych oraz zaprojektowanie par starterów do reakcji PCR było zrealizowane przy pomocy pakietu QDD ver. 3.1.2 (Megléc i in., 2010, 2014).

Ze względu na bardzo dużą ilość potencjalnych markerów (liczba powyżej 10000) wybrano 26 di- oraz tri-nukleotydowych loci mikrosatelitarnych do dalszych analiz. Wybór opierał się na selekcji markerów z krótkimi motywami powtórzeń, gdyż na ogół wykazują one stosunkowo wysoki polimorfizm oraz zawierają unikalny motyw powtórzeń (Castoe i in., 2012). Regiony flankujące wybranych markerów zostały zachowane aby zaprojektować unikalne pary działających starterów (Castoe i in., 2010; Megléc i in., 2010). W procedurach selekcji uwzględniono również rozmiar locus i optymalne temperatury przyłączania starterów,

aby w przyszłości można było wykonywać reakcje multipleksowe w amplifikacji produktów PCR.

Polimorfizm wybranych loci został oceniony na podstawie próby 26 osobników oznaczonych jako *O. avicularia* oraz 10 osobników oznaczonych jako *O. chloropus*. Reakcje PCR w objętości 20 μL , z zastosowaniem 10 μl DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 4,8 μl wody dejonizowanej (Thermo Scientific Inc., Waltham, USA), 1,6 μl poszczególnych starterów i 2 μL DNA o stężeniu większym, niż 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Warunki termocyklera obejmowały denaturację wstępną (95°C przez 3 min), 34 cykle (95°C przez 30 s, temperatury wiązania specyficzne dla starterów przez 1 min, 72°C przez 1 min) oraz końcową elongację (72°C przez 5 min). Produkty amplifikacji oceniano na żelach agarozowych (2%).

Genotypowanie wykonano w firmie zewnętrznej Genomed (Warszawa), przy wykorzystaniu barwnika fluorescyjnego 6-FAM, a wielkości alleli określono względem standardu GeneScan 600 LIZ z wykorzystaniem oprogramowania Geneious ver. 11.1.5.

6.4. Analiza statystyczna

6.4.1. Rozdział I i II

W celu oceny jakości markerów mikrosatelitarnych i potencjalnych błędów genotypowania zastosowano program Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) wykorzystujący metodę opracowaną przez Brookfielda (1996). Markery wykazujące wysoką częstość alleli zerowych oraz błędy wynikające z nieprecyzyjnej amplifikacji produktu PCR (ang. *stuttering*) zostały wykluczone z dalszych analiz. Pozostałe markery, które nie wykazywały istotnych błędów oraz odchyłeń od równowagi Hardy'ego-Weinberga (test χ^2 , GenAlEx 6.5; Peakall i Smouse, 2006), ani sprzężeń genetycznych (test w FStat 2.9.4; Goudet, 1995; z poprawką Bonferroniego) zostały uwzględnione w dalszych analizach.

W analizie różnorodności genetycznej obliczono m.in. średnie bogactwo alleli (N_a), heterozygotyczność obserwowaną (H_o), oczekiwaną (H_e) oraz współczynnik wsobności (FIS) w programie GenAlEx 6.5. Różnice w heterozygotyczności i bogactwie alleli pomiędzy wpleszczami z różnych gatunków żywicielskich testowano za pomocą ANOVA i uogólnionych liniowych modeli mieszanych (GLMM), gdzie loci były traktowane jako czynnik losowy (Statistica 13.3.0, TIBCO).

Zróznicowanie genetyczne między grupami określono na podstawie współczynników FST (Weir i Cockerham, 1984) oraz Dest (Jost, 2008) obliczanych w GenAlEx 6.5. Struktura

genetyczna została zbadana metodą bayesowską w programie STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard i in., 2000), a optymalną liczbę klastrow ustalono przy użyciu metody ΔK (Evanno i in., 2005). Zastosowano DAPC w pakiecie *adegenet* (Jombart i in., 2010) w środowisku R, wybierając optymalną liczbę komponentów głównych na podstawie α -score (*optim.a.score*), a wyniki wizualizowano funkcją *scatter.dapc*.

6.4.2. Rozdział III

W badaniu uwzględniono dane ekologiczne oraz cechy historii życiowej 157 gatunków ptaków. Zebrano informacje dotyczące wieku, płci, miejsca i daty odłowu oraz liczby osobników, u których stwierdzono obecność wpleszczy. Dodatkowo, uwzględniono proporcję dorosłych osobników do młodych oraz szereg cech środowiskowych, klimatycznych i fizjologicznych.

Średnią szerokość geograficzną lęgów oraz dystans wędrówkowy obliczono na podstawie geometryczne środki geograficznych zasięgów lęgowych i zimowisk, wyznaczonych na podstawie map rozmieszczenia z BirdLife International i Handbook of the Birds of the World (2016). Obliczenia przeprowadzono zgodnie z metodologią opisaną przez Miniasa i Włodarczyka (2020) wykorzystując funkcję *gCentroid* z pakietu *rgeos* w środowisku R. Dystans migracyjny został obliczony jako odległość kołowa pomiędzy centroidami obszarów lęgowych oraz zimowisk.

Dane klimatyczne w obrębie zasięgów lęgowych obejmowały cztery zmienne: średnią roczną temperaturę (°C), sezonowość temperatury (odchylenie standardowe $\times 100$), średnie roczne opady (mm) oraz sezonowość opadów (współczynnik zmienności). Dane te pochodziły z bazy WorldClim v2.0 (Fick i Hijmans, 2017) i miały rozdzielczość przestrzenną 10 minut łuku. Średnie wartości tych zmiennych wyliczono dla każdego gatunku na podstawie zasięgów lęgowych przy użyciu funkcji *lets.summarizer* z pakietu *letsR*.

Dane o masie ciała (g) oraz wielkości zniesienia (liczba jaj) pochodziły ze standardowych źródeł ornitologicznych (del Hoyo i in., 1992-2011; Snow i Perrins, 1998; Dunning, 2008). Ze względu na prawoskośność rozkładów, obie zmienne zostały logarytmicznie przekształcone przed analizą.

Na podstawie bazy AVONET (Tobias i in., 2021) przypisano gatunkom dodatkowe cechy ekologiczne: typ siedliska, poziom troficzny, niszę pokarmową, metody żerowania oraz

typ gniazda. Typy siedlisk sklasyfikowano w 10 kategorii, poziom troficzny w 3, a nisze pokarmowe w 7. Wśród typów gniazda wyróżniono 3 kategorie.

Do analizy czynników wpływających na zróżnicowanie intensywności pasożytowania zastosowano bayesowskie modele mieszane z uwzględnieniem pokrewieństwa filogenetycznego, zaimplementowane w pakiecie MCMCglmm (Hadfield, 2010) w środowisku R (Core Team, 2024). Zmienną zależną była liczba osobników, u których stwierdzono obecność wpleszczy (rozkład Poissona). Liczba przebadanych osobników została uwzględniona jako offset w skali logarytmicznej.

Zmienne biogeograficzne (szerokość geograficzna lęgów, dystans migracyjny), klimatyczne (średnia temperatura i opady w zasięgu lęgowym), ekologiczne (typ siedliska, nisza troficzna, typ gniazda), biologiczne (masa ciała, wielkość zniesienia), a także struktura wiekowa populacji (proporcja dorosłych) i mediana daty odłowu, były traktowane jako efekty stałe. Powiązania filogenetyczne między gatunkami gospodarzy zostały uwzględnione jako efekt losowy. Filogenezę odtworzono na podstawie skalibrowanego czasowo drzewa ptaków dostępnego na serwerze BirdTree (Jetz i in., 2021) uwzględniając niepewność filogenetyczną poprzez wykorzystanie 1000 alternatywnych drzew opartych na topologii Ericsona i innych (2006). Drzewa zostały przetworzone w programie Geneious v.10.0.5 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) i zsumowane do drzewa konsensusowego.

W modelach zastosowano niespecyficzne rozkłady a priori dla komponentów wariancji (wartość wariancji = 1, parametr pewności = 0,002 w strukturach R i G), natomiast współczynnik offsetu był traktowany jako znany i ustalony na wartość 1 (rozkład a priori silny). Symulacje MCMC przeprowadzono w łańcuchach o długości 500 000 iteracji, z 100 000 iteracjami spalania początkowego (ang. *burn-in*) i próbkowaniem co 400 iterację (ang. *thinning*) uzyskując 1000 próbek rozkładów posteriorowych. Średnia efektywna liczebność próbki (ESS) wynosiła $948,7 \pm 129,3$. Zbieżność łańcuchów oceniano zarówno wizualnie na podstawie wykresów śladów (ang. *trace plots*), jak i przy pomocy diagnostyki opracowanej przez Geweke (1992) zakładając wartość graniczną $|z| < 1,96$.

Wszystkie modele pierwotnie szacowano na pełnym zbiorze danych ($n = 157$ gatunków ptaków). W celu oceny wpływu gatunków z małą próbą (potencjalnie zawyżającą poziom pasożytowania) przeprowadzono także analizy na podzbiorze z co najmniej 10 przebadanymi osobnikami na gatunek ($n = 105$). Redukcję modeli przeprowadzono jednorazowo, usuwając zmienne o niskiej istotności ($p > 0,25$) unikając wielokrotnego testowania i związanego z tym ryzyka błędów typu I (Mundry i Nunn, 2008).

7. Wyniki i dyskusja

7.1. Rozdział I

Przed opracowaniem nowych markerów mikrosatelitarnych dla wpleszczy z rodzaju *Ornithomya*, przetestowano amplifikację markerów zaprojektowanych dla *Basilina nana* - gatunku wpleszcza, który jest pasożytem nietoperzy. Żaden spośród 10 przetestowanych markerów nie amplifikował się skutecznie ani u *O. avicularia* ani u *O. chloropus* (uzyskano brak lub niespecyficzne produkty PCR).

Markery mikrosatelitarne były opracowywane w oparciu o genom *O. avicularia*, w którym zidentyfikowano 12 541 potencjalnych markerów mikrosatelitarnych. Dla każdego markera zaprojektowano średnio 10 primerów, co dało ponad 126 000 par primerów. Najczęściej występowały motywy di- i trinukleotydowe, z dominującym motywem AC (33,3%). Markery zawierające więcej niż jeden motyw powtórzeń (5,1%) wykluczono z dalszych analiz.

Spośród 26 testowanych markerów na *O. avicularia* jeden (OrAv3) nie amplifikował się skutecznie i został wykluczony, zaś trzy (OrAv10, OrAv20, OrAv22) były monomorficzne i również zostały usunięte z dalszych analiz. Pozostałe 22 markery wykazały polimorfizm (≥ 2 allele). Średni wskaźnik amplifikacji wyniósł 80,29%. Dwa markery (OrAv4, OrAv13) wykazały silną obecność alleli zerowych (>0.15) i zostały wykluczone. Trzy inne (OrAv11, OrAv16, OrAv17) miały umiarkowane wartości. Siedemnaście markerów wykazało niską częstość alleli zerowych, brak sprzężeń genetycznych, a 13 z nich miało wysoką wartość informacyjną (PIC > 0.5). Osiemnaście markerów nie odbiegało od równowagi Hardy'ego-Weinberga.

Amplifikacja u *O. chloropus* wykazała, że cztery markery (OrAv3, OrAv15, OrAv16, OrAv18) nie amplifikowały się w przypadku tego gatunku. Pozostałe miały średni wskaźnik amplifikacji 74,5%. Osiem markerów było monomorficznych, a 14 wykazało polimorfizm (2-8 allele na locus). Zaobserwowane heterozygotyczności wahały się między 0,12 a 1,00.

Badanie to dostarczyło nowego narzędzia molekularnego do analizy genetycznej *O. avicularia* oraz pokrewnych gatunków. Dotychczasowe badania na wpleszczach ptasich nie były skoncentrowane na genetycznych aspektach tych pasożytów, ale skupiały się przede wszystkim na identyfikacji taksonomicznej i detekcji patogenów, które są przez nie przenoszone. W naszym badaniu przeprowadzono również sekwencjonowanie DNA, które stanowiło potwierdzenie prawidłowej identyfikacji morfologicznej osobników uwzględnionych w analizach.

Opracowane markery mikrosatelitarne okazały się być skuteczne w analizach struktury populacyjnej *O. avicularia*, a wyniki opisane w pracy dały możliwość ich wykorzystania także u *O. chloropus*. Użycie ich u innych, bardziej odległych taksonomicznie gatunków wpleszczy pozostaje w sferze spekulacji, stąd potrzebne są dalsze badania nad możliwością ich wykorzystania. Pomimo wykorzystania pojedynczego osobnika do sekwencjonowania uzyskano ponad 12 000 potencjalnych markerów, co pokazuje, że nawet pojedyncze próbki mogą być wystarczające w tego typu analizach dla organizmów niemodelowych. Markery mikrosatelitarne, dzięki swojej liczebności oraz wysokiemu polimorfizmowi są dobrym narzędziem do badań nad historią ewolucyjną, zmiennością genetyczną i strukturą populacyjną wpleszczy znacznie przewyższając pod tym względem markery mitochondrialne.

7.2. Rozdział II

Poziom polimorfizmu genetycznego w populacjach *O. avicularia* pasożytujących na różnych gatunkach ptaków okazał się zbliżony. Średnie bogactwo alleliczne wynosiło 6,9 alleli na locus i wahało się od 6,71 u wpleszczy z uszatek do 7,11 u wpleszczy z kszyków. Różnice między populacjami nie były istotne statystycznie (ANOVA, $F_{3,64} = 0,37$; $p = 0,773$). Podobnie średnia heterozygotyczność obserwowana wyniosła 0,642 dla wszystkich loci i nie wykazywała istotnych różnic pomiędzy wpleszczami związanymi z różnymi gospodarzami (GLMM, $F_{3,91} = 1,29$; $p = 0,283$). Średnia wartość współczynnika inbredu (F_{is}) wynosiła 0,12, co nie wskazuje na silne zjawisko wsobności.

Analizy zróżnicowania genetycznego oparte na indeksie F_{ST} i $Dest$ ujawniły podobne wzorce różnic między populacjami związanymi z różnymi gospodarzami. Największe, choć wciąż niskie, wartości różnicowania stwierdzono między wpleszczami z kszyków a tych z gatunków trzcinowych ($F_{ST} = 0,017$; $p = 0,011$; $Dest = 0,025$; $p = 0,001$). Istotne różnice wykazano także pomiędzy osobnikami z uszatek, a wróblowymi gospodarzami, trzcinakami i trzciniczkami ($F_{ST} = 0,015$; $p = 0,012$; $Dest = 0,019$; $p = 0,035$) oraz kosami ($F_{ST} = 0,017$; $p = 0,032$; $Dest = 0,018$; $p = 0,012$). Najmniejsze, nieistotne statystycznie, zróżnicowanie stwierdzono między wpleszczami z kosów i kszyków.

Analiza STRUCTURE wskazała na obecność dwóch klastrów genetycznych, przy czym dominował klaster obecny we wszystkich populacjach, co sugeruje ograniczony stopień izolacji populacyjnej. Drugi klaster pojawiał się częściej u osobników pasożytujących na kszycach i kosach, co może świadczyć o istnieniu genetycznie odrębnej populacji związanej z tymi gospodarzami. Analiza DAPC potwierdziła podobny wzorec. Wpleszcze z trzcinaków,

trzcinniczków i uszatki grupowały się ze sobą i były wyraźniej oddzielone od osobników z kszyków i kosów. To rozdzielenie było szczególnie widoczne wzdłuż pierwszej funkcji dyskryminacyjnej (DF1), która wyjaśniała największą część wariacji między populacjami (wartości własne: 87,69 dla DF1 wobec 62,80 dla DF2).

Uzyskane wyniki nie potwierdziły przewidywań o silnym zróżnicowaniu genetycznym wpleszczy w zależności od filogenezy czy ekologii gospodarzy. Najniższe wartości zróżnicowania genetycznego odnotowano pomiędzy taksonami filogenetycznie i ekologicznie odległymi (kszyk i kos). Jednocześnie ogólny stopień różnicowania był niski, co wskazuje na istnienie stosunkowo silnego przepływu genów między populacjami wpleszczy zasiedlającymi różne gatunki gospodarzy. Wynik ten był związany prawdopodobnie z wysokimi zdolnościami dyspersyjnymi *O. avicularia*, ułatwionymi przez obecność dobrze rozwiniętych, utrzymywanych przez całe życie skrzydeł umożliwiających wielokrotną zmianę gospodarza w trakcie życia. Zachowywanie skrzydeł przez wpleszcze z rodzaju *Ornithomya* (w przeciwieństwie do gatunków z rodzaju *Lipoptena*, które je odrzucają) pozwala *O. avicularia* na aktywny lot i zmiany gospodarzy także pomiędzy gatunkami odległymi filogenetycznie.

Na kształtowanie struktury genetycznej mogą również wpływać cechy gospodarzy, takie jak, strategie żerowania, intensywność pielęgnacji upierzenia, zachowania społeczne czy strategia rozrodu. W przypadku moich badań żywicieli reprezentowali zróżnicowane strategie migracyjne, przy czym żaden z gatunków nie tworzył dużych, zwartych stad w okresie migracji. Mogło to ograniczać transmisję pasożytów zależnych od skupisk gospodarzy, ale jednocześnie sprzyjać przenoszeniu przez *O. avicularia* na inne gatunki żywicieli w miejscach postojowych ze względu na dużą mobilność tego pasożyta. Przykładowo, zbieżność szlaków migracyjnych kosa i kszyka w Europie Środkowej może sprzyjać wymianie pasożytów między tymi ekosystemowo różnymi gatunkami.

Stosunkowo niski poziom zróżnicowania genetycznego może również wynikać z doboru równoważącego, faworyzującego cechy skuteczne w szerokim spektrum środowisk i gospodarzy. Alternatywnie, możliwe jest, że ekspansja na odległych filogenetycznie gospodarzy zachodzi dzięki adaptacjom, które redukują potrzebę lokalnej specjalizacji. Niewykluczone również, że czas izolacji między populacjami pasożytów jest zbyt krótki aby doprowadzić do silnej dywergencji genetycznej. Tempo zmian ewolucyjnych pasożytów zależy bowiem od długości cyklu życiowego, strategii rozrodu oraz presji selekcyjnych ze strony gospodarzy i środowiska.

7.3. Rozdział III

Spośród 157 gatunków ptaków uwzględnionych w analizach, obecność wpleszczy stwierdzono u 79 gatunków (ok. 50%). Po wykluczeniu gatunków o niskiej liczebności próby (<10 osobników) udział gatunków zarażonych wzrósł do około 70% (73 z 105). Wśród gatunków, u których stwierdzono wpleszcze całkowita prevalencja wahała się od 0,07% do 26,7%, przy medianie wynoszącej 2,2%. Najwyższe wartości odnotowano u gatunków takich jak uszatka (18,2%), puszczyk *Strix aluco* (26,7%) oraz wąsatka *Panurus biarmicus* (22,1%). Łącznie zidentyfikowaliśmy siedem gatunków wpleszczy należących do trzech rodzajów. Były to: *Ornithomya fringillina*, *O. avicularia*, *O. biloba*, *O. chloropus*, *Icosta ardeae*, *Lipoptena fortisetosa* i *L. cervi*. Dwa pierwsze gatunki (*O. fringillina* i *O. avicularia*) zdecydowanie dominowały w materiale, stanowiąc odpowiednio 49,0% i 36,8% wszystkich zebranych osobników.

Ornithomya fringillina wykazywała stosunkowo wysoki stopień specyficzności względem gospodarzy, pasożytując niemal wyłącznie na ptakach wróblowych (40 gatunków). Pasożyt ten był szczególnie liczny u ptaków związanych ze środowiskami wodno-błotnymi, m.in. u wąsatki (11,4%), świerszczaka *Locustella luscinioides* (4,2%) i podróżniczka *Luscinia svecica* (3,8%). W przeciwieństwie do niej *O. avicularia* wykazywała charakter wyraźnie bardziej generalistyczny występując u 40 gatunków reprezentujących osiem rzędów ptaków. Najwięcej znaleziono jej na puszczyku (20%), uszatce (18,6%), dzięciole czarnym *Dryocopus martius* (7,7%) oraz kropiatce *Porzana porzana* (7,1%). Pozostałe gatunki z rodzaju *Ornithomya* były dużo rzadsze. *Ornithomya biloba* (8,7% wszystkich osobników) charakteryzowała się dużą specjalizacją niemal wyłącznie pasożytując na dymówkach *Hirundo rustica* (pojedyncze osobniki stwierdzono jedynie u świerszczaka i łożówki *Acrocephalus palustris*). *Ornithomya chloropus* (3,9%) miała szerszy zakres gospodarzy i została znaleziona u dziewięciu gatunków, zarówno wróblowych (np. trzcinniczka), jak i niewróblowych (najliczniej u ksyka). Gatunki z rodzaju *Lipoptena*, których typowymi żywicielami są ssaki, pojawiały się sporadycznie na ptakach stanowiąc łącznie 1,6% wszystkich zebranych wpleszczy.

Analiza uwzględniająca dane filogenetyczne dla całego zbioru (n = 157 gatunków ptaków) wykazała istotne związki między pięcioma cechami gospodarzy, a ogólną prevalencją wpleszczy. Po pierwsze, większa masa ciała gospodarzy była istotnie związana z wyższym prawdopodobieństwem występowania pasożytów ($\beta = 0,908$; 95% CI: 0,212 do 1,678; $p = 0,014$). Drugim ważnym czynnikiem był dystans migracji. Dalecy migranci byli rzadziej zasiedlani przez wpleszcze ($\beta = -0,0001$; 95% CI: -0,0002 do 0,0000; $p = 0,020$). Ponadto

częstość występowania pasożytów malała wraz ze wzrostem średnich rocznych opadów w zasięgu lęgowym gospodarzy ($\beta = -0,004$; 95% CI: -0,007 do -0,002; $p = 0,002$). Kolejnym, istotnym parametrem okazał się typ siedliska. Gatunki ptaków związane z lasami i terenami trawiastymi wykazywały niższą prewalencję wpleszczy niż ptaki związane z siedliskami o charakterze wodno-błotnym (siedliska leśne: $\beta = -1,181$; 95% CI: -1,900 do -0,521; $p = 0,002$; tereny trawiaste: $\beta = -1,258$; 95% CI: -2,481 do -0,166; $p = 0,030$). Dodatkowo, ptaki wszystkożerne były istotnie rzadziej zasiedlane przez pasożyty niż gatunki drapieżne żerujące na kręgowcach ($\beta = -1,507$; 95% CI: -2,839 do -0,200; $p = 0,040$). Pozostałe cechy żywicieli uwzględnione w analizach, takie jak wiek, termin schwywania, wielkość lęgu, szerokość geograficzna miejsc lęgowych, średnia temperatura roczna na terenach lęgowych oraz typ gniazda, nie wykazywały istotnego wpływu na prewalencję wpleszczy (wszystkie $p > 0,05$). Wyniki analiz opartych na danych z gatunków o większej liczebności były zasadniczo zgodne potwierdzając znaczenie opadów, siedliska i niszy pokarmowej, przy jedynie marginalnej istotności dla masy ciała i dystansu migracyjnego.

Oddzielne modele dla dwóch najpospolitszych gatunków wpleszczy, *O. avicularia* i *O. fringillina*, wykazały wyraźnie odmienne zależności pomiędzy cechami żywicieli, a prewalencją tych pasożytów. Masa ciała żywicieli była istotnie dodatnio skorelowana z obecnością *O. avicularia* ($\beta = 2,499$; 95% CI: 1,495 do 3,527; $p < 0,001$), natomiast w przypadku *O. fringillina* zależność była odwrotna ($\beta = -1,914$; 95% CI: -3,189 do -0,630; $p < 0,010$). Średnie roczne opady negatywnie wpływały na występowanie *O. avicularia* ($\beta = -0,006$; 95% CI: -0,010 do -0,001; $p = 0,004$), ale nie wykazywały istotnego związku z obecnością *O. fringillina*. Dystans migracyjny okazał się natomiast kluczowym wskaźnikiem dla *O. fringillina*, która rzadziej występowała u dalekodystansowych migrantów ($\beta = -0,0002$; 95% CI: -0,0003 do -0,00005; $p = 0,010$). W przypadku *O. avicularia* związek ten nie został wykazany. Typ siedliska był jedynym aspektem biologii żywicieli, który warunkował występowanie obu gatunków, zarówno *O. avicularia*, jak i *O. fringillina* występowały rzadziej u gospodarzy związanych z siedliskami leśnymi niż z mokradłami (*O. avicularia*: $\beta = -1,088$; 95% CI: -2,136 do -0,002; $p = 0,050$; *O. fringillina*: $\beta = -2,288$; 95% CI: -3,200 do -1,376; $p < 0,001$). Dodatkowo, *O. fringillina* znacznie rzadziej występowała u gatunków zasiedlających typy środowisk zaklasyfikowane do kategorii „inne” (wybrzeża, siedliska skaliste, pochodzenia antropogeniczne) niż u gatunków związanych z mokradłami ($\beta = -2,597$; 95% CI: -4,937 do -0,443; $p = 0,010$). Pozostałe zmienne (wiek, termin złapania, wielkość lęgu, szerokość geograficzna miejsc lęgowych, średnia temperatura roczna na terenach lęgowych, nisza pokarmowa oraz typ gniazda) nie wykazywały istotnych związków

z przewalencją żadnego z dwóch gatunków ($p > 0,05$). Analizy ograniczone do gatunków z próbą ≥ 10 osobników potwierdziły te zależności. Dla *O. avicularia* istotne pozostały związki z masą ciała i opadami, natomiast dla *O. fringillina* - z masą ciała, dystansem migracyjnym i siedliskiem. W analizach na podzbiorach danych wykryto ponadto istotny wpływ typu gniazda na występowanie *O. avicularia* (wyższa przewalencja u gatunków gniazdujących w otwartych gniazdach nadrzewnych niż w dziuplach; $\beta = 1,187$; 95% CI: 0,000–2,350; $p = 0,046$) oraz wpływ opadów na obecność *O. fringillina* (niższa u gatunków z obszarów o większych sumach opadów; $\beta = -0,006$; 95% CI: -0,012 do 0,000; $p = 0,044$).

Przeprowadzone analizy wykazały, że przewalencja wpleszczy u ptaków w okresie migracji jest kształtowana przez zestaw kluczowych cech gospodarzy, obejmujących przede wszystkim masę ciała, dystans migracyjny, typ siedliska, warunki klimatyczne oraz niszę troficzną. Najsilniejszym z nich okazała się masa ciała; większe ptaki były częściej zasiedlane, co może być związane zarówno z większą powierzchnią ciała i dostępnością zasobów dla pasożytów, jak i potencjalnie niższą skutecznością pielęgnacji upierzenia. Uzyskane wyniki ujawniły kontrastujące strategie dwóch dominujących gatunków pasożytów: *O. avicularia* preferowała gospodarzy dużych rozmiarów i charakteryzowała się szerokim zakresem ekologicznym, natomiast *O. fringillina* była silniej związana z małymi wróblakami, a jej występowanie malało wraz ze wzrostem masy ciała i dystansu migracyjnego żywiciela. Wskazuje to, że nawet w obrębie rodzaju *Ornithomya* różne gatunki mogą reprezentować odmienne strategie ekologiczne. Porównanie z wcześniejszymi badaniami (Lehikoen i in., 2021), które wykazały przeciwne wzorce w Skandynawii, sugeruje, że preferencje wpleszczy względem cech gospodarzy mogą wykazywać znaczną zmienność sezonową (inną w okresie lęgowym niż podczas migracji). Otrzymane wyniki mają także istotne implikacje epidemiologiczne. Wysoka mobilność i szeroka gama gospodarzy, szczególnie u *O. avicularia*, mogą sprzyjać rozprzestrzenianiu się patogenów wielogatunkowych wzdłuż szlaków migracyjnych ptaków. Szlaki te, pod wpływem zmian klimatycznych i nasilającej się antropopresji, mogą ulegać modyfikacjom, co sprzyja przenoszeniu wpleszczy, a wraz z nimi zasiedlających je mikroorganizmów chorobotwórczych, na nowych żywicieli, poza ich dotychczasowe zasięgi.

8. Podsumowanie i wnioski

1. Analiza genomu *O. avicularia* umożliwiła zidentyfikowanie ponad 12 000 potencjalnych markerów mikrosatelitarnych, z czego po selekcji uzyskano 17 markerów o wysokiej wartości informacyjnej i dużym sukcesie amplifikacji.
2. Markery te wykazały skuteczność również u *O. chloropus* - gatunku blisko spokrewnionego z *O. avicularia*, choć z nieco niższym wskaźnikiem amplifikacji.
3. Analizy genetyczne wykazały, że populacje *O. avicularia* pasożytujące na różnych gatunkach ptaków są słabo zróżnicowane genetycznie mimo odmienności ekologicznej i filogenetycznej ich gospodarzy.
4. Uzyskane dane sugerują wysoki przepływ genów, co może wynikać z mobilności pasożyta, jego zdolności do zmiany gospodarza w ciągu życia oraz gromadzenia się ptaków w trakcie migracji.
5. Markery mikrosatelitarne okazały się skutecznym narzędziem do badania struktury populacyjnej wpleszczy.
6. Analiza danych z 157 gatunków ptaków wykazała, że niektóre cechy biologiczne i ekologiczne gospodarzy mają istotny wpływ na obecność pasożytów.
7. Cechami gospodarzy negatywnie korelującymi z obecnością wpleszczy były:
 - a) większy dystans migracyjny;
 - b) wyższe opady roczne na terenach lęgowych;
 - c) związek z siedliskami leśnymi,
 - d) wszystkożerność.
8. Pozytywny wpływ na obecność tych pasożytów miała większa masa ciała gospodarzy (cięższe ptaki były częściej i silniej zarażone).
9. Wykazaliśmy, że *Ornithomya avicularia*:
 - a) jest gatunkiem generalistycznym, częstszym u ptaków o wyższej masie ciała;
 - b) rzadziej występuje u gatunków leśnych, niż u gatunków związanych z siedliskami wilgotnymi.
10. *Ornithomya fringillina* to gatunek:
 - a) rzadziej obecny u dalekodystansowych migrantów i gatunków związanych z terenami o charakterze leśnym, skalistymi, wybrzeżami i obszarami przekształconymi przez człowieka;
 - b) preferuje żywicieli o niższej masie ciała, głównie małe ptaki wróblowe.

11. Uzyskane wyniki wskazują, że elementy biologii żywicieli, takie jak masa ciała, dystans migracji, preferencje siedliskowe gospodarzy oraz czynniki klimatyczne, takie jak opady odgrywają istotną rolę w kształtowaniu wzorców występowania wpleszczy.

9. Literatura

Bartos, M., Włodarczyk, R., Iciek, T., Piasecka, A., Janiszewski, T., & Minias, P. (2020). Louse flies of Charadrii and Scolopaci shorebirds migrating through Central Europe. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(2), 414–418. <https://doi.org/10.7589/2019-01-018>

Bartosik, K., Maślanko, W., Buczek, A., Asman, M., Witecka, J., Sz waj, E., Błaszkiwicz, P. S., & Świsłocka, M. (2021). Two new haplotypes of *Bartonella* sp. isolated from *Lipoptena fortisetosa* (Diptera: Hippoboscidae) in SE Poland. *Insects*, 12(6), 485. <https://doi.org/10.3390/insects12060485>

Boucheikhchoukh, M., Mechouk, N., Benakhla, A., Raoult, D., & Parola, P. (2019). Molecular evidence of bacteria in *Melophagus ovinus* sheep keds and *Hippobosca equina* forest flies collected from sheep and horses in northeastern Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.05.010>

Böse, R., & Petersen, K. (1991). *Lipoptena cervi* (Diptera), a potential vector of *Megatrypanum* trypanosomes of deer (Cervidae). *Parasitology Research*, 77(8), 723–725. <https://doi.org/10.1007/BF00928691>

Brookfield JF. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 1996; 5: 453–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1996.tb00336.x>

Buckingham, L. J., & Ashby, B. (2022). Coevolutionary theory of hosts and parasites. *Journal of evolutionary biology*, 35(2), 205–224. <https://doi.org/10.1111/jeb.13981>

Burakova, O. (1998). Detection of the spirochete *Borrelia burgdorferi* in louse flies *Lipoptena cervi* Linnaeus (Hippoboscidae). In 4th International Congress of Dipterology (pp. 8–29). Keble College, Oxford.

Buss, M., Case, L., Kearney, B., Coleman, C., & Henning, J. D. (2016). Detection of Lyme disease and anaplasmosis pathogens via PCR in Pennsylvania deer ked. *Journal of Vector Ecology*, 41(2), 292–294. <https://doi.org/10.1111/jvec.12225>

Chodkiewicz, T., Chylarecki, P., Sikora, A., Wardecki, Ł., Bobrek, R., Neubauer, G., Marchowski, D., Dmoch, A., & Kuczyński, L. (2019). Raport z wdrażania art. 12 Dyrektywy Ptasiej w Polsce w latach 2013–2018: stan, zmiany, zagrożenia. *Biuletyn Monitoringu Przyrody*, 20, 1–80.

- Čisovská Bazsalovicsová, E., Víchová, B., Oboňa, J., Radačovská, A., Blažeková, V., & Králová-Hromadová, I. (2023). Bird louse flies *Ornithomya* spp. (Diptera: Hippoboscidae) as potential vectors of mammalian *Babesia* and other pathogens. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 23(5), 275–283. <https://doi.org/10.1089/vbz.2022.0088>
- Combes, C. (2001). *Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions*. University of Chicago Press.
- Dawkins, R., & Krebs, J. R. (1979). Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 205(1161), 489–511. <https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0081>
- Decaestecker, E., Gaba, S., Raeymaekers, J. A. M., Stoks, R., Van Kerckhoven, L., Ebert, D., & De Meester, L. (2007). Host–parasite ‘Red Queen’ dynamics archived in pond sediment. *Nature*, 450(7171), 870–873. <https://doi.org/10.1038/nature06291>
- Deitsch, K. W., Lukehart, S. A., & Stringer, J. R. (2009). Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 493–503. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2145>
- del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (Eds.). *Handbook of the Birds of the World. Vol. 3. Hoatzin to Auks* (pp. 496). Barcelona: Lynx Edicions. (1996).
- del Hoyo J, Elliott A, Christie DA (Eds.). *Handbook of the Birds of the World. Vol. 10. Cuckoo-shrikes to Thrushes* (pp. 645-646). Barcelona: Lynx Edicions. (2005).
- Dick, C. W. (2006). Checklist of world Hippoboscidae (Diptera: Hippoboscoidea). *Field Museum of Natural History*, 1–7.
- Ebert D. (1998). Experimental evolution of parasites. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5393), 1432–1435. <https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1432>
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 2005; 14: 2611–2620.
- Farajollahi, A., Crans, W. J., Nickerson, D., Bryant, P., Wolf, B., Glaser, A., & Andreadis, T. G. (2005). Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(4), 474–476. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)21\[474:DOWNVR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)21[474:DOWNVR]2.0.CO;2)

Gandon, S., & Michalakis, Y. (2000). Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1452), 985–990. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1100>

Goudet J. FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 1995; 86: 485–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>

Gutiérrez-López, R., Martínez-de la Puente, J., Gangoso, L., Soriguer, R. C., & Figuerola, J. (2015). Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of hematophagous louse flies (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of Vector Ecology*, 40(1), 11–15. <https://doi.org/10.1111/jvec.12127>

Hart B. L. (1990). Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 14(3), 273–294. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80038-7](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80038-7)

Harkonen, L., Kaitala, A., Kaunisto, S., & Repo, T. (2012). High cold tolerance through four seasons and all free-living stages in an ectoparasite. *Parasitology*, 139(7), 926–933. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000091>

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2017). *Immunobiology: The immune system in health and disease* (9th ed.). Garland Science.

Jetz, W., Thomas, G.H., Joy, J.B., Hartmann, K., Mooers, A.O. (2012). The global diversity of birds in space and time, *Nature*, 491, 444–448. <https://doi.org/10.1038/nature11631>

Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 2010; 11: 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>

Jost L. GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol. Ecol.* 2008; 17: 4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>

Kaunisto, S., Harkonen, L., Rantala, M. J., & Kortet, R. (2015). Early-life temperature modifies adult encapsulation response in an invasive ectoparasite. *Parasitology*, 142(10), 1290–1296. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000591>

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of

- sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28: 1647–1649.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Keve, G., Csörgő, T., Kováts, D., et al. (2024). Contributions to our knowledge on avian louse flies (Hippoboscidae: Ornithomyiinae) with the first European record of the African species *Ornithoctona laticornis*. *Parasites & Vectors*, 17, 237. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06303-8>
- Keller, V., Herrando, S., Voříšek, P., et al. (2020). European breeding bird atlas 2: Distribution, abundance and change. European Bird Census Council & Lynx Edicions.
- Klei, T. R., & Degiusti, D. L. (1975). Observations on the bionomics of *Pseudolynchia canariensis* (Diptera: Hippoboscidae). *Parasitology*, 70(2), 195–202.
<https://doi.org/10.1017/S0031182000049660>
- Koleček, J., Procházka, P., El-Arabany, N., et al. (2016). Cross-continental migratory connectivity and spatiotemporal migratory patterns in the great reed warbler. *Journal of Avian Biology*, 47, 756–767. <https://doi.org/10.1111/jav.00929>
- Lehikoinen, A., Pohjola, P., Valkama, J., Mutanen, M., & Pohjoismäki, J. L. O. (2021). Promiscuous specialists: Host specificity patterns among generalist louse flies. *PLoS ONE*, 16(3), e0247698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247698>
- Levesque-Beaudin, V., & Sinclair, B. J. (2021). Louse fly (Diptera, Hippoboscidae) associations with raptors in southern Canada, with new North American and European records. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 16, 168–174.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.09.007>
- Liu, D., Wang, Y. Z., Zhang, H., Liu, Z. Q., Wureli, H., Wang, S. W., Tu, C. C., & Chen, C. F. (2016). First report of *Rickettsia raoultii* and *R. slovaca* in *Melophagus ovinus*, the sheep ked. *Parasites & Vectors*, 9, 600. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1885-7>
- Minias, P., Włodarczyk, R., Meissner, W., et al. (2010). The migration system of Common Snipe *Gallinago gallinago* on autumn passage through Central Europe. *Ardea*, 98(1), 13–19.
<https://doi.org/10.5253/078.098.0103>
- Oboňa, J., Sychra, O., Greš, S., et al. (2019). A revised annotated checklist of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) from Slovakia. *ZooKeys*, 862, 129–152.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.862.25992>

- Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—An update. *Bioinformatics* 2006; 28: 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pfeiffer, E. (1905). Ueber trypanosomenähnliche Flagellaten im Darm von *Melophagus ovinus*. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 50, 324–330.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000; 155: 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Procházka, P., Hobson, K. A., & Karcza, Z. (2008). Birds of a feather winter together: Migratory connectivity in the Reed Warbler *Acrocephalus scirpaceus*. *Journal of Ornithology*, 149, 141–150. <https://doi.org/10.1007/s10336-007-0250-1>
- R Core Team (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rani, P., Coleman, G. T., Irwin, P. J., & Traub, R. J. (2011). *Hippobosca longipennis* – a potential intermediate host of a species of *Acanthocheilonema* in dogs in northern India. *Parasites & Vectors*, 4, 143. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-143>
- Regier, Y., Komma, K., Weigel, M., et al. (2018). Microbiome analysis reveals the presence of *Bartonella* spp. and *Acinetobacter* spp. in deer keds (*Lipoptena cervi*). *Frontiers in Microbiology*, 9, 3100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03100>
- Santolíkuvá, A., Brzoňová, J., Čepička, I., & Svobodová, M. (2022). Avian louse flies and their trypanosomes: New vectors, new lineages and host–parasite associations. *Microorganisms*, 10(3), 584. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030584>
- Schmid-Hempel, P. (2011). *Evolutionary parasitology: The integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics*. Oxford University Press.
- Spina, F., Baillie, S. R., Bairlein, F., Fiedler, W., & Thorup, K. (Eds.). (2022). *The Eurasian African Bird Migration Atlas*. EURING/CMS. <https://migrationatlas.org>
- Spurgin, L. G., & Richardson, D. S. (2010). How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1684), 979–988. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2084>

- Szewczyk, T., Werszko, J., Steiner-Bogdaszewska, Ż., et al. (2017). Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland. *Parasites & Vectors*, 10, 487. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2413-0>
- Thompson, J. N. (2005). *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press.
- TIBCO Statistica, v. 13.3.0. TIBCO Software Inc.; 2017. <https://www.tibco.com/products/tibco-statistica>
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 2004; 4: 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Van Schaik, J., Dekeukeleire, D., Gazaryan, S., et al. (2018). Comparative phylogeography of a vulnerable bat and its ectoparasite reveals dispersal of a non-mobile parasite among distinct evolutionarily significant units of the host. *Conservation Genetics*, 19, 481–494. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1024-9>
- Van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1, 1–30.
- Walker, M. D., & Rotherham, I. D. (2010). Temperature affects emergence of *Crataerina pallida* (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of Medical Entomology*, 47(6), 1235–1237. <https://doi.org/10.1603/ME10125>
- Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 1984; 38: 1358–1370.
- Werszko, J., Steiner-Bogdaszewska, Ż., Jeżewski, W., et al. (2020). Molecular detection of *Trypanosoma* spp. in *Lipoptena cervi* and *Lipoptena fortisetosa* (Diptera: Hippoboscidae) and their potential role in the transmission of pathogens. *Parasitology*, 147(13), 1629–1635. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001584>
- Woolhouse, M. E. J., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., & Levin, B. R. (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics*, 32(4), 569–577.
- Yatsuk, A. A., Triseleva, T. A., Narchuk, E. P., Matyukhin, A. V., & Safonkin, A. F. (2023). Morphology of the wings and attachment apparatus in the evolution of the family Hippoboscidae (Diptera). *Integrative Zoology*, 18(5), 941–954. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12786>

10. Dorobek naukowy

Pozostałe publikacje:

Minias, P., Janiszewska, A., Pikus, E., Zadworny, T., & Anderwald, D. (2021). MHC reflects fine-scale habitat structure in white-tailed eagles, *Haliaeetus albicilla*. *Journal of Heredity*, 112(4), 335–345. <https://doi.org/10.1093/jhered/esab026>

Impact Factor: 3.832, punkty MNiSW: 100

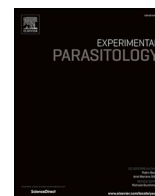
Janiszewski, T., Janiszewska, A., Minias, P., Wężyk, M., & Włodarczyk, R. (2024). Gniazdowanie szablodzioba *Recurvirostra avosetta* i szczudłaka *Himantopus himantopus* na zbiorniku Jeziorsko w latach 2020–2023. *Ornis Polonica*, 65, 265–271.

punkty MNiSW: 5

11. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Rozdział I

Janiszewska, A., Bartos, M., Trębicki, Ł., Remisiewicz, M., Cierlik, G., Minias, P., Rewicz, T., 2023. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies. *Experimental Parasitology*. 255, 108652.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108652>.



Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies

Aleksandra Janiszewska^{a,*}, Maciej Bartos^{a,**}, Łukasz Trębicki^b, Magdalena Remisiewicz^c, Grzegorz Cierlik^d, Piotr Minias^a, Tomasz Rewicz^b

^a University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Biodiversity Studies and Bioeducation, Banacha 1/3, 90-237, Lodz, Poland

^b University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Invertebrate Zoology and Hydrobiology, Banacha 12/16, 90-237, Lodz, Poland

^c University of Gdańsk, Bird Migration Research Station, Wita Stwosza 59, 80-308, Gdansk, Poland

^d Polish Academy of Sciences, Institute of Nature Conservation, Mickiewicza 33, 31-120, Krakow, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Birds
Hippoboscidae
Louse flies
Ectoparasites
Avian parasites
Microsatellite markers

ABSTRACT

Louse flies (Diptera: Hippoboscidae) are obligatory hematophagous ectoparasites of birds and mammals. These widely distributed parasitic flies may have a significant impact on wild and farm animals by feeding on their blood and transmitting bloodborne pathogens. However, despite their ecological importance, louse flies are clearly underrepresented in host-parasite research and implementation of genetic approaches in this group is generally hampered by lacking molecular tools. In addition, louse flies that parasitize long-distance migrants can travel long distances with their avian hosts, facilitating the large-scale spread of pathogens across landscapes and geographic regions. Given the wide diversity of louse flies that parasitize a variety of avian hosts, their direct negative impact on host survival, and their high potential to transmit bloodborne pathogens even along avian migration routes, it is surprising that our knowledge of louse fly ecology is rather modest and incomplete. Here, we aimed to develop a novel molecular tool for polyxenous avian louse flies from the genus *Ornithomya*, which are among the most common and widely distributed representatives of Hippoboscidae family, to improve research of their genetic population structure and molecular ecology.

Using the Illumina Mi-seq sequencing, we conducted a genome-wide scan in *Ornithomya avicularia* to identify putative microsatellite markers. A panel of 26 markers was selected to develop amplification protocols and assess polymorphism in the Central European population of *O. avicularia*, as well as to test for cross-amplification in a congeneric species (*O. chloropus*).

A genome-scan in *O. avicularia* identified over 12 thousand putative microsatellite markers. Among 26 markers selected for a population-wide screening; one did not amplify successfully and three were monomorphic. 22 markers were polymorphic with at least two alleles detected. Two markers showed presence of null alleles. A cross-amplification of microsatellite markers in *O. chloropus* revealed allelic polymorphism at 14 loci, with the mean allelic richness of 3.78 alleles per locus (range: 2–8).

Our genome-wide scan in *O. avicularia* provides a novel and powerful tool for molecular research in *Ornithomya* louse flies. Our panel of polymorphic microsatellite loci should allow genotyping of louse flies from geographically distinct populations and from a wide spectrum of avian hosts, enhancing population genetic and phylogeographic research in *Ornithomya*.

1. Introduction

Louse flies (Hippoboscidae, Diptera) are hematophagous

ectoparasites of birds and mammals. These obligatory parasites spend their adult life in the fur, among feathers, or in the nests of their hosts, where they feed on their blood (Baker, 1967). They express a high

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: aleksandra.janiszevska2@edu.uni.lodz.pl (A. Janiszewska), maciej.bartos@biol.uni.lodz.pl (M. Bartos), lukasz.trebicki@biol.uni.lodz.pl (Ł. Trębicki), magdalena.remisiewicz@biol.ug.edu.pl (M. Remisiewicz), cierlik@iop.krakow.pl (G. Cierlik), piotr.minias@biol.uni.lodz.pl (P. Minias), tomasz.rewicz@biol.uni.lodz.pl (T. Rewicz).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108652>

Received 10 August 2023; Received in revised form 25 October 2023; Accepted 31 October 2023

Available online 7 November 2023

0014-4894/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

degree of unique morphological and physiological adaptations to their ectoparasitic lifestyle, and their life cycles are finely tuned to the host phenology (Lehikoinen et al., 2021). Louse flies are characterized by various degrees of host specificity, ranging from polyxeny, which is observed in a number of species, including *Ornithomya avicularia* (one of the most widespread louse flies parasitizing birds in the Palearctic region (Oboňa et al., 2019)), to monoxeny characteristic for example for *Melophagus ovinus*, a parasite of sheep (Boucheikhchoukh et al., 2019; Liu et al., 2016). All louse flies are parasites of homeothermic animals and the majority of 213 species described so far feed on avian blood. Among the three subfamilies of Hippoboscidae, the members of Ornithomyinae (171 species) are generally bird parasites, Lipopteninae (34 species) are mammal parasites, while Hippoboscinae (8 species) are dominated by mammal parasites, except for a single bird specialist parasite (Dick, 2006).

Hippoboscids feeding on mammal blood, classified in the subfamily Lipopteninae, are known as keds. They have long been considered as important agents affecting condition of farm animals by direct bites, leading to blood loss and local infections, but even more importantly as vectors of bloodborne pathogens, including *Trypanosoma melophagium* (Pfeiffer, 1905), *Megatrypanum trypanosomes* (Böse and Petersen, 1991) and *Bartonella* sp. (Bartosik et al., 2021). Louse flies parasitizing wild mammals have recently gained significant scientific attention as vectors spreading potentially zoonotic pathogens. *Lipoptena cervi* (Buss et al., 2016; Werszko et al., 2020) or *Hippobosca longipennis* (Rani et al., 2011) can transmit various species of *Trypanosoma*, *Acanthocheilonema*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Borrelia burgdorferi* (Burakova, 1998). *Lipoptena cervi* has also been widely reported to be infected with *Bartonella* spp. (Peña-Espinoza et al., 2023; Regier et al., 2018; Szewczyk et al., 2017). Bird-specialized louse flies have also been reported to transmit epidemiologically important pathogens, but they seem highly understudied in this context. *Ornithomya avicularia* was found to be a vector of *Trypanosoma avium* (Baker, 1967), and the West Nile virus was detected in *Icosta americana* retrieved from birds of prey (Farajollahi et al., 2005). Evidence for the presence of *Babesia* spp., *Wolbachia* spp., and *Trypanosoma corvi* was recently reported in *Ornithomya avicularia* and *Ornithomya biloba* (Čisovská Bazsalovicsová et al., 2023). Transmission of flies most often occurs in the nest, where they can parasitize on nestlings and their parents, but it can also occur in places where adult birds aggregate, e.g., during communal feeding and roosting on migration stopover sites (Nartshuk et al., 2022). Also, louse flies parasitizing long-distance migrants can travel long distances with their avian hosts, facilitating large-scale pathogen dispersal across landscapes and geographic regions (Bartos et al., 2020).

Considering the high diversity of louse flies parasitizing a wide range of bird hosts, their direct negative effect on host survival, and a high potential to transmit bloodborne pathogens even along bird migratory routes (Herman, 1945), it is surprising that our knowledge about the ecology of louse flies is rather modest and fragmentary. Implementation of genetic approaches in molecular ecology research in louse flies is hampered by the lack of molecular tools. In general, louse flies have rarely been studied with molecular methods. Mitochondrial DNA barcoding was used in the identification of several species, including *Icosta americana*, *Ornithomya anchineuria*, *O. avicularia*, *O. bequaerti*, *O. metallica*, *O. fringillina*, *Ornithophila gestroi*, *Crataerina hirundinis*, and *C. pallida* (Lehikoinen et al., 2021; Gutiérrez-López, 2015; Levesque-Beaudin and Sinclair, 2021). Some of these studies focused on the comparative phylogeography of host species and their parasites. Implementation of nuclear molecular markers, such as microsatellites, in louse flies has been even more limited. In fact, we are aware of only one study using microsatellite genotyping in louse flies to compare genetic population structure of the fly *Basilia nana* and its host, the Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*) (Van Schaik et al., 2018). The results provided evidence for contrasting patterns between the parasite and host, revealing significant genetic divergence of bat populations within the geographical range in Europe, but no geographic divergence in

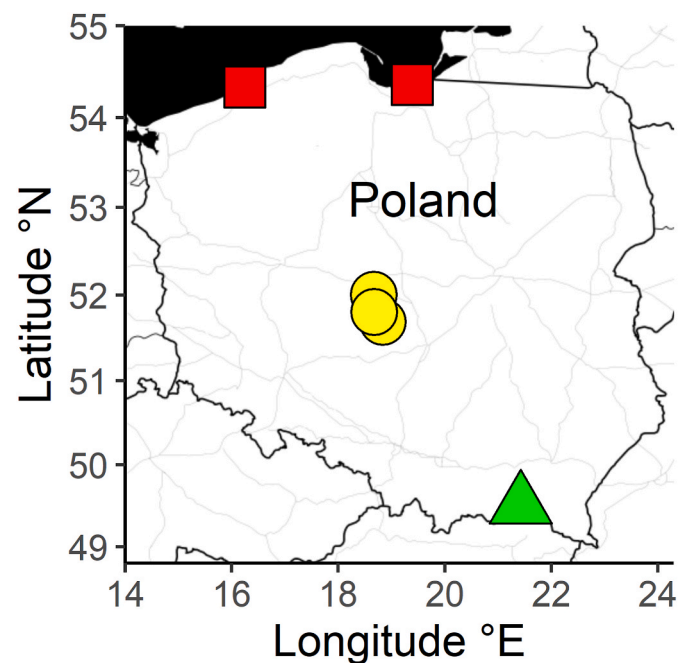


Fig. 1. Map showing the outline of the study area and the points where the louse flies were collected (detailed coordinates are given in the text).

B. nana (Van Schaik et al., 2018).

In this study, we focused on two *Ornithomya* species: *O. avicularia* and *O. chloropus*. Both species are among the most common European louse flies, and both have a wide range of hosts, including birds from 10 orders and over 65 genera (Maa, 1969; Borowiec, 1984; Eeva and Klemola, 2013). The study aimed to develop a new molecular tool based on microsatellite markers, which is expected to be highly useful in molecular ecology and populations genetics research in the genus *Ornithomya*.

For this purpose, we first conducted a genome-wide scan of putative microsatellite markers in *O. avicularia*. Second, we selected a panel of markers to quantify population-wide polymorphism in *O. avicularia* and to assess cross-amplification rate in a congeneric species, *O. chloropus*.

2. Material and methods

Louse flies were collected between 2011 and 2019 from birds migrating along the south coast of the Baltic Sea (54° 21' 56.50" N; 19° 23' 24.60" E; 54° 20' 17.66" N; 16° 14' 43.09" E), through the lowlands of Central Poland (52° 00' 20.8" N, 18° 39' 28.6" E; 51° 44' 15.5" N, 18° 39' 47.50" E; 51° 41' 25.9" N, 18° 49' 19.7" E) and in Southern Poland (49° 30' 15.40" N; 21° 25' 28.90" E) (Fig. 1, Table S1). Birds were captured during long-term bird ringing schemes with mist nets and tunnel traps. The hosts included two species of thrushes Turdidae (Eurasian blackbird *Turdus merula* and Song thrush *Turdus philomelos*) and five species of Charadrii and Scolopaci shorebirds (Common snipe *Gallinago gallinago*, Common redshank *Tringa totanus*, Dunlin *Calidris alpina*, Ruff *Calidris pugnax*, and Wood sandpiper *Tringa glareola*). Following standard bird ringing procedures, all individuals were aged, measured, and weighed. Wing and body feathers were carefully inspected for louse fly presence. The flies were collected manually and preserved in 96% ethanol. All collected flies were identified under stereomicroscope with ID key developed by Borowiec (1984). Those identified as *Ornithomya avicularia* (n = 26) and *O. chloropus* (n = 10) were used for molecular analyses. We used Bio-Trace DNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland) to extract DNA from biological material (2–3 legs) from all individuals. We generally followed the protocol provided by the manufacturer, although we extended the time of tissue lysis incubation to 72 h.

We used genome-wide sequencing to design a broad panel of

Table 1

Details and characterisation of selected (n = 26) microsatellite markers in *Ornithomya avicularia*. Ta – annealing temperature; * – no amplification.

Marker	Product size (bp)	Primer sequence	Repeat motif	Ta (°C)
OrAv1	179–197	F: TTGCAATGGAAGCTGTTGGTG R: AGTATAGTTCTCCTCGTTCGGT	AGC	51
OrAv2	72–105	F: GTTTGCTACTTGCACATTTAAATT R: TGTATAACGGGATTGTTGGTGT	AAC	51
OrAv3	*	F: TGAGAGCAATAATTTGGGCCA R: CGAAGGATCATTAAATGTTTCATGGC	AAC	53
OrAv4	118–154	F: TCCTCCTCAAGGCTTGATC R: ATGGCACCCGTATAACACC	ACC	54
OrAv5	126–140	F: TACGACTGCAAGGAAATGCT R: GCGAAGTAACATCCATATAAATAAACCC	AC	52
OrAv6	224–257	F: ACTTGTACACCACTTCCTTGT R: CTGACCTCAATAATGGCACCG	ACC	53
OrAv7	243–339	F: GCTACATGTACGCTGTGTCA R: TGGGATTAACGTAATTGTCTCCG	AC	53
OrAv8	149–189	F: TCTAACCTAAGATGTTAATGATTGCAA R: ACTTACGTCATACCTCAGCTGT	AC	53
OrAv9	173–197	F: TACAAACGCCTGCCTTTTG R: TGGACTTAATGGGAGTAAGGGC	AACC	53
OrAv10	118–136	F: ACCAGAGCTCCACAAAGCAT R: AATTTATAACACGTAGCGTATGGC	AC	52
OrAv11	120–144	F: TGACGTTTACAGATTATAACAGCT R: TCACCAACGGCATTAAATGAATGA	AC	52
OrAv12	202–220	F: CCGCCAACACCGTATCAATG R: TCCGCCTACACAGCATGA	AAC	54
OrAv13	129–141	F: ACAACTCAACGCATCACAACA R: ACGTCCGCCTCATTGTAA	AAC	51
OrAv14	100–127	F: CAGCACATCCAAAGGTACCA R: ACGCTCTTTCCTTCTCGTTT	AGC	51
OrAv15	136–154	F: TGCTTTAGTGTTCCTTTGACTCACA R: AGTATATGCAAAATATGTGTGAGCAT	AC	52
OrAv16	114–123	F: AAGAGAACACTTTATGGGCCA R: CCCGGTTGGTCAAGTGATTC	AAT	52
OrAv17	187–211	F: TCTACGCTCGCAGTACATC R: GCAGTTCCTAGCAAGCAACC	AG	54
OrAv18	181–199	F: TGTTCCTGTGTGTGATGTTGTTG R: AACAGCAACAGCAGCATACT	AAC	48
OrAv19	199–217	F: CTGGTGGCGGTCTTGTGATA R: AGCTGAACCGGATGAACCTG	ACC	54
OrAv20	180–255	F: GAAATGGGTGCAACGACGC R: ACACAACCTGCTACTGCTGCT	AAG	53
OrAv21	97–135	F: AAACAACACAGACGCACGC R: CCCATTGCCCTTAAACAT	AC	52
OrAv22	72–90	F: AAACAATCAGTTTCAGTACAACCT R: CTGGCACTTGTATGGTCTGTC	AGC	54
OrAv23	195–219	F: TCAAGAAACAACAACACCACCT R: TCAACGGTGAGACAATAGCA	ACC	51
OrAv24	113–137	F: AAACAAGGCCAACAGACCT R: CGCGTGGCTTTGTGTTTCA	AAC	51
OrAv25	107–139	F: AACACACACAAGTACATTTGC R: TCTGTTATAAAGTGCATCAACAACCT	ACAT	51
OrAv26	116–155	F: AACAGACCAGTCCGTCGTTT R: TACACGGCCACACTCAACTA	AAC	52

putative microsatellite markers for *O. avicularia*. We used DNA extract from a single randomly selected individual (WP023) to prepare sequencing libraries with short insert (ca. 350 bases) with NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB). Sequencing was done using MiSeq (Illumina) in 2 × 250 bp paired end reads mode. The sequences were trimmed using Cutadapt ver. 1.16. (Martin, 2011). Read assembly was performed using MaSuRCA ver. 3.3.0. (Zimin et al., 2013), while microsatellite detection and PCR primer sequence design were performed using the QDD software ver. 3.1.2. (Megléc et al., 2010, 2014). All the steps including library preparation and primer design were performed at Genomed (Warsaw, Poland).

Second, based on the dataset obtained via genome-wide sequencing, we selected 26 unique markers to assess their polymorphism in *O. avicularia* and test for cross-amplifications in a congeneric species,

O. chloropus. Due to the large number of available putative markers (n > 10 000, see results for details) our choice was based on general principles like selection of markers with small di- and trinucleotide repeat motifs that are generally likely to show high polymorphism, as well as the ones containing a unique repeat motif per contig (Castoe et al., 2012). Flanking regions of selected markers were conserved (i.e. without short-repeat nanosatellites) to design unique working primer pairs (Castoe et al., 2010; Megléc et al., 2010). In the selection procedures we also considered locus size and optimal primer annealing temperatures, so that multiplex PCR amplifications could be developed in further studies.

Targeted amplifications and polymorphism of all selected loci were evaluated using DNA extracts from 26 individuals (including WP023) of *O. avicularia* and 10 individuals of *O. chloropus* (Table S1). Due to possible morphological misidentification of *Ornithomya* louse fly species reported by Levesque-Beaudin and Sinclair (2021), we DNA barcoded all *O. avicularia* individuals and two randomly selected individuals of *O. chloropus* to confirm our identification. Protocol for DNA amplification, enzymatic purification, sequencing, sequence editing, and aligning was presented in detail by Rewicz et al. (2021). Relevant voucher information, taxonomic classification, and DNA barcode sequences are publicly accessible through the dataset DS-AJHIPP (DOI: <https://doi.org/10.5883/DS-AJHIPP>) in BOLD (www.boldsystems.org) (Ratnasingham and Hebert, 2007). Newly obtained COI sequences were deposited in GenBank under accession numbers OQ029444 - OQ029471.

PCRs for microsatellite amplifications were prepared in a final volume of 20 µL and consisted of 10 µL DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), 4.8 µL ultrapure sterile water (Thermo Scientific), 1.6 µL–50 µM concentrated forward and reverse primers, and 2 µL DNA extract with concentration not lower than 10 ng/µL. Reactions were run at the initial denaturation step at 95 °C for 3 min, followed by 34 cycles consisting of 30 s at 95 °C, 1 min at annealing temperatures (Ta) specific for particular markers (Table 1) and 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 5 min. All amplifications were checked on 2% agarose gels. No multiplexing was conducted in the amplification procedures. Microsatellite genotyping was conducted by Genomed (Warsaw, Poland) using 6-FAM fluorescent dye and allele sizes were scored against GeneScan™ 600 LIZ Standard (Thermo Fisher Scientific Inc.) in Geneious v.11.1.5 software (Kearse et al., 2012).

We calculated the number of alleles observed (Na), heterozygosity observed (Ho) and expected (He) for *O. avicularia* using GeneAlix 6.5 (Peakall and Smouse, 2012). To estimate the frequency of null alleles we used Micro-Checker v. 2.2.3. (Van Oosterhout et al., 2004). Deviations of allele frequencies from Hardy-Weinberg equilibrium were also assessed with chi-square tests in GeneAlix 6.5. We used Genepop 4.7.5 (Rousset, 2008) to quantify inbreeding coefficient (Fis) and Cervus 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007) to calculate polymorphism information content (PIC) for each marker. Linkage disequilibrium was tested in FStat 2.9.4 (Goudet, 1995) and Holm-Bonferroni correction was used to adjust p values for multiple pairwise comparisons. Due to limited sample size, we only calculated basic polymorphism statistics (Ho and He) for *O. chloropus* using GeneAlix 6.5. All values are reported as means ± SE.

3. Results

3.1. Unsuccessful cross-genus amplification of existing markers

Before developing novel microsatellite markers for *O. avicularia*, we tested cross-amplification of existing markers originally designed for *Basilia nana* (Van Schaik et al., 2015, Van Schaik et al., 2018), which is a parasitic bat fly from the same family. We tested all available markers (n = 10) on 15 individuals of *O. avicularia*, however, amplifications were not successful, yielding either no or non-specific PCR products.

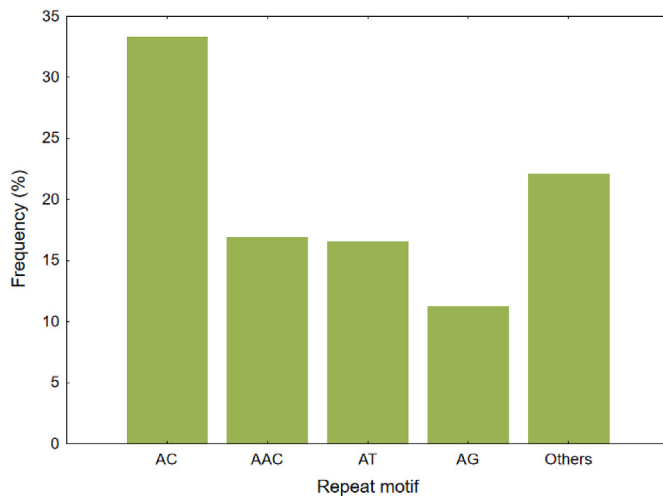


Fig. 2. Frequency of repeat motifs across all designed microsatellite markers (n = 12 541).

Table 2

Polymorphism of selected microsatellite markers in *Ornithomya avicularia*. Na – number of alleles; Ho – observed heterozygosity; He – expected heterozygosity; Fis – inbreeding coefficient; PIC – polymorphism information content, NullF – null allele frequency, * – excluded from further analysis, NA – no amplification.

Locus	Na	Ho	He	Fis	PIC	NullF	% positive amplification
OrAv1	5	0.65	0.49	0.21	0.43	0.00	92.7
OrAv2	9	0.89	0.71	0.23	0.87	0.00	73.1
OrAv3	*	*	*	*	*	*	NA
OrAv4	*	*	*	*	*	*	*
OrAv5	4	0.38	0.4	0.33	0.35	0.03	88.5
OrAv6	8	0.75	0.8	0.32	0.77	0.03	73.1
OrAv7	23	0.91	0.93	0.79	0.92	0.01	65.4
OrAv8	3	0.28	0.31	0.01	0.28	0.03	96.1
OrAv9	5	0.54	0.46	0.31	0.4	0.00	96.1
OrAv10	*	*	*	*	*	*	*
OrAv11	5	0.52	0.69	0.27	0.63	0.11	96.1
OrAv12	4	0.33	0.29	0.43	0.28	0.00	84.6
OrAv13	*	*	*	*	*	*	*
OrAv14	7	0.65	0.73	0.15	0.69	0.06	100
OrAv15	7	0.75	0.7	-0.001	0.67	0.00	76.9
OrAv16	3	0.12	0.21	-0.03	0.2	0.15	73.1
OrAv17	4	0.46	0.58	0.23	0.54	0.12	96.1
OrAv18	8	0.72	0.83	0.82	0.81	0.07	69.2
OrAv19	4	0.64	0.65	0.23	0.58	0.02	92.3
OrAv20	*	*	*	*	*	*	*
OrAv21	6	0.68	0.62	0.01	0.55	0.00	76.9
OrAv22	*	*	*	*	*	*	*
OrAv23	2	0.08	0.07	-0.01	0.07	0.00	92.3
OrAv24	4	0.69	0.53	-0.09	0.49	0.00	100
OrAv25	6	0.73	0.75	0.17	0.71	0.01	53.8
OrAv26	10	0.9	0.82	0.09	0.8	0.00	80.8

3.2. Genome-wide microsatellite identification in *O. avicularia*

Using genome-wide scan in *O. avicularia* we obtained a dataset containing 12 541 putative microsatellite markers (Table S2). An average of 10.07 ± 0.06 primer pairs were designed per marker (range: 1–92), resulting in a total of 126 268 designed primer pairs within the entire dataset (Table S2). The mean size of regions targeted by primers was 159.78 ± 43.88 bp. Repeat motif sizes ranged from two to six bp, including 124 different motifs. Di- and trinucleotide motifs were most frequent (8 402 putative markers, 67% of all, Table S2), with a maximum frequency of 33.3% recorded for AC motif (Fig. 2). Among all the markers, 5.1% contained more than one repeat motif (max. four

Table 3

Polymorphism of selected microsatellite markers in *Ornithomya chloropus*. Na – number of alleles; Ho – observed heterozygosity; He – expected heterozygosity; NullF – null allele frequency; * – excluded from further analysis.

Locus	Na	Ho	He	NullF	% positive amplification
OrAv1	4	0.67	0.62	0.04	90
OrAv2	3	0.43	0.36	0.00	70
OrAv3	*	*	*	*	*
OrAv4	3	0.33	0.49	0.11	60
OrAv5	4	0.62	0.58	0.00	80
OrAv6	6	0.89	0.68	0.00	90
OrAv7	*	*	*	*	90
OrAv8	*	*	*	*	20
OrAv9	4	0.50	0.6	0.04	80
OrAv10	*	*	*	*	90
OrAv11	*	*	*	*	70
OrAv12	3	0.57	0.6	0.00	70
OrAv13	*	*	*	*	60
OrAv14	2	0.12	0.12	0.00	80
OrAv15	*	*	*	*	*
OrAv16	*	*	*	*	*
OrAv17	3	0.56	0.49	0.00	90
OrAv18	*	*	*	*	*
OrAv19	2	0.33	0.28	0.00	60
OrAv20	*	*	*	*	*
OrAv21	*	*	*	*	*
OrAv22	*	*	*	*	*
OrAv23	4	0.50	0.58	0.06	60
OrAv24	2	0.29	0.24	0.00	70
OrAv25	5	0.50	0.74	0.13	80
OrAv26	8	1.00	0.85	0.00	80

motifs per marker) and these were excluded from downstream analyses.

3.3. Amplification and polymorphism in *O. avicularia*

Out of 26 markers selected to assess targeted amplifications and polymorphism in *O. avicularia*, one (OrAv3) showed unsuccessful amplification across most samples and was removed from downstream analyses. Three markers were monomorphic within our samples (OrAv10, OrAv20, OrAv22) and also removed from further analysis, while the remaining 22 markers showed allelic polymorphism (at least two alleles recorded per marker) (Table 2). The mean amplification rate was $80.29 \pm 2.86\%$ of samples. Unsuccessful amplifications were determined from three attempts per sample.

We found strong signature of null alleles (> 0.15) at two polymorphic markers (OrAv4, OrAv13) and they were excluded from downstream analyses. Another three markers (OrAv11, OrAv16, OrAv17) showed moderately strong signature of null alleles (0.10–0.15) and their implementation in genetic research on *O. avicularia* should be cautious, at least until tested on larger samples. Seventeen polymorphic markers showed little evidence for null alleles (Table 2). Also, no evidence was found for linkage disequilibrium between the markers. The number of alleles varied between 2 and 23 per marker (Table 2). Thirteen markers showed high abilities to detect polymorphism ($PIC > 0.5$). Eighteen markers did not deviate significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium. The maximum value of Fis was 0.82 (Table 2).

3.4. Cross-amplification in *O. chloropus*

Cross-amplification of four markers was not successful (OrAv3, OrAv15, OrAv16, OrAv18). The remaining markers cross-amplified successfully with the mean amplification rate of $74.5 \pm 3.46\%$ samples. Allele scoring indicated that eight markers (OrAv7, OrAv8, OrAv10, OrAv11, OrAv13, OrAv20, OrAv21, OrAv22) were monomorphic within our sample (n = 10 individuals). Among the polymorphic markers (n = 14), the number of alleles varied between 2 and 8 per locus and the mean observed heterozygosity was 0.12–1.00 (Table 3).

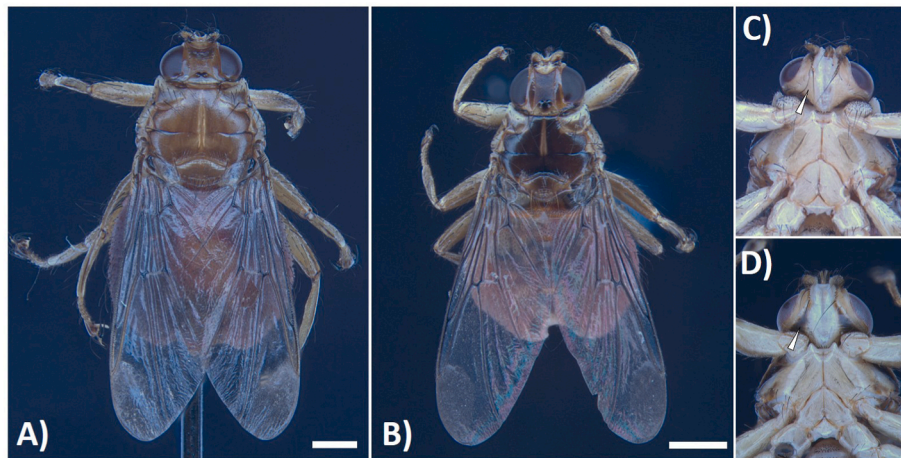


Fig. 3. *Ornithomya avicularia* A), C) and *Ornithomya chloropus* B), D). White arrows indicate species-specific details.

4. Discussion

Our study provides a novel and solid molecular tool for *Ornithomya avicularia* and related species, which can spark genetic research in louse flies. With these loci it may be possible to detect differentiation between specimens of louse flies from various populations. So far, studies focusing on avian louse flies rarely considered genetic aspects of their biology. More frequently, molecular approaches were implemented in studies focusing on zoonotic pathogens transmitted by louse flies, especially those species that parasitize mammals.

Although research on population genetics in louse flies has been virtually lacking, molecular techniques have been successfully applied for taxonomic identification of louse flies and pathogens they transmit (Böse and Petersen, 1991; Bartosik et al., 2021; Farajollahi et al., 2005). Here, our molecular identification through DNA barcoding proved successful, confirming the results of morphological identification (*O. avicularia*, *O. chloropus*) (Fig. 3). Previously, DNA barcoding was also used by Levesque-Beaudin and Sinclair (2021) to identify louse flies collected from birds of prey migrating through Canada. They found discrepancy between molecular and morphological identification of louse flies species of *Ornithomya*; three species were morphologically misidentified. Molecular taxonomic studies in Hippoboscidae are, nevertheless, far from common. Poor taxonomic recognition of this group may lead to serious gaps in our understanding of complex relationships between louse flies and their hosts, possibly also overlooking some of the pathogens transmitted by these blood-sucking ectoparasites. For this reason, an application of molecular methods for taxonomic identification (DNA barcoding) of louse flies should be enhanced, but at the same time development of novel tools for quantification of louse fly phylogeographic patterns and assessment of population genetic structure is important.

In this study, we developed new microsatellite markers that can be used as molecular tools to study the population genetic structure of *O. avicularia*. Cross-validation of our markers in *O. chloropus* showed that our dataset can be successfully used for this *Ornithomya* species. It requires further testing if our molecular tool can be effectively cross-applied in more distantly related hippoboscids from other genera. It is, however, worth noting that although we only tested for targeted amplification of a few dozen markers, our full dataset comprises information on thousands of putative microsatellite loci, which may also be used in future research. Thus, our data should provide a helpful tool to explore the population structure of louse flies in either spatial, temporal, or demographic scales (i.e., among different bird host species and locations).

The development of genetic markers may be aided by sequencing libraries from numerous individuals and we used a single individual.

However, this individual yielded a dataset of more than 12 000 putative microsatellite loci, more than sufficient for powerful molecular research in *Ornithomya*. In fact, designing microsatellite markers in non-model organisms is frequently accomplished through the genome-wide sequencing of a single individual. For instance in the studies by Castoe et al. (2012, 2010) sequencing libraries were prepared using the DNA of also a single specimen. The microsatellite markers we developed are suitable to investigate subtle intra-species differences in allele frequencies that may not be detectable with other, less polymorphic markers (e.g. mitochondrial DNA). Although population differentiation can be apparent in the genomic regions under selection (e.g. through local adaptations) (Riginos and Cunningham, 2005), assessing genome-wide neutral variation with non-genic microsatellite markers is essential to understand population dynamics and evolutionary history of parasites, their diversity and distribution. Thanks to relative abundance, good genome coverage and high degree of polymorphism (Powell et al., 1996) microsatellite markers will be useful for further genetic studies of *Ornithomya* louse flies.

Author statement

Aleksandra Janiszewska: Conceptualization, Sample collection, Data curation, Methodology, Software, Writing.

Maciej Bartos: Conceptualization, Sample collection, Manuscript revision.

Łukasz Trębicki: Methodology, Data curation.

Magdalena Remisiewicz: Sample collection.

Grzegorz Cierlik: Sample collection.

Piotr Minias: Conceptualization, Data curation, Software, Manuscript revision.

Tomasz Rewicz: Conceptualization, Data curation, Software, Manuscript revision.

Declaration of competing interest

None

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We are grateful to all the volunteers who helped with collecting samples in the field, especially participants of Operation Baltic, Operation Carpatica, and Jeziorsko ornithological camps. We also thank

Tomasz Iciek and Tomasz Janiszewski for their participation in material collection. We thank two anonymous reviewers for constructive comments on the earlier draft of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108652>.

References

- Baker, J.R., 1967. A Review of the Role Played by the *Hippoboscidae* (Diptera) as Vectors of Endoparasites, pp. 412–418.
- Bartos, M., Włodarczyk, R., Iciek, T., Piasecka, A., Janiszewski, T., Minias, P., 2020. Louse flies of Charadrii and Scolopaci shorebirds migrating through Central Europe. *J. Wildl. Dis.* 56, 414–418.
- Bartosik, K., Maślanko, W., Buczek, A., Asman, M., Witecka, J., Szwaj, E., Błaszczewicz, P.S., Świsłocka, M., 2021. Two new haplotypes of *Bartonella* sp. isolated from *Lipoptena fortisetosa* (Diptera: Hippoboscidae) in SE Poland. *Insects* 12, 485.
- Borowiec, L., 1984. Klucze Do Oznaczania Owadów Polski Cz. XXVIII Muchówki - Diptera Z. 77 Wpłyszczowate - Hippoboscidae. PWN, Warszawa, Wrocław. PTent.
- Böse, R., Petersen, K., 1991. *Lipoptena cervi* (Diptera), a potential vector of *Megatrypanum trypanosomes* of deer (Cervidae). *Parasitol. Res.* 77, 723–725.
- Boucheikhchouk, M., Mechouk, N., Benakhlā, A., Raoult, D., Parola, P., 2019. Molecular evidence of bacteria in *Melophagus ovinus* sheep keds and *Hippobosca equina* forest flies collected from sheep and horses in northeastern Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 65, 103–109.
- Burakova, O., 1998. Detection of the Spirochete *Borrelia burgdorferi* in Louse Flies *Lipoptena Cervi* Linnaeus (Hippoboscidae). 4th International Congress of Dipterology. Keble College, Oxford, pp. 8–29.
- Buss, M., Case, L., Kearney, B., Coleman, C., Henning, J.D., 2016. Detection of lyme disease and anaplasmosis pathogens via PCR in Pennsylvania deer ked. *J. Vector Ecol.* 41, 292–294.
- Castoe, T.A., Poole, A.W., de Koning, A.P.J., Jones, K.L., Tomback, D.F., et al., 2012. Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PLoS One* 7 (2), e30953.
- Castoe, T.A., Poole, A.W., Gu, W., de Koning, A.P.J., Daza, J.M., Smith, E.N., Pollock, D. D., 2010. Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 341–347.
- Čisovská Bazsalovicsová, E., Vichová, B., Oboňa, J., Radačovská, A., Blažeková, V., Králová-Hromádová, I., 2023. Bird Louse Flies *Ornithomya* spp. (Diptera: Hippoboscidae) as Potential Vectors of Mammalian *Babesia* and Other Pathogens. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont N.Y.) 23 (5), 275–283. <https://doi.org/10.1089/vbz.2022.0088>.
- Dick, C.W., 2006. Checklist of World *Hippoboscidae* (Diptera: Hippoboscoidea). Department of Zoology, Field Museum Natural History, Chicago, IL, pp. 1–7.
- Eeva, T., Klemola, T., 2013. Variation in prevalence and intensity of two avian ectoparasites in a polluted area. *Parasitology* 140, 1384–1393.
- Farajollahi, A., Crans, W.J., Nickerson, D., Bryant, P., Wolf, B., Glaser, A., Andreadis, T. G., 2005. Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21, 474–476.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86, 485–486.
- Gutiérrez-López, R., Martínez-de la Puente, J., Gangoso, L., Sorriquer, R.C., Figuerola, J., 2015. Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of hematophagous louse flies (Diptera: Hippoboscidae). *J. Vector Ecol.* 40, 11–15.
- Herman, C.M., 1945. Hippoboscid flies as parasites of game animals in California. *Calif. Fish Game* 31, 16–25.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1099–1106.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinform* 28, 1647–1649.
- Lehikoinen, A., Pohjola, P., Valkama, J., Mutanen, M., Pohjoismäki, J.L.O., 2021. Promiscuous specialists: host specificity patterns among generalist louse flies. *PLoS One* 16.
- Levesque-Beaudin, V., Sinclair, B.J., 2021. Louse fly (Diptera, Hippoboscidae) associations with raptors in southern Canada, with new North American and European records. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. INT J PARASITOL-PAR* 16, 168–174.
- Liu, D., Wang, Y.Z., Zhang, H., Liu, Z.Q., Wureli, H., Wang, S.W., Tu, C.C., Chen, C.F., 2016. First report of *Rickettsia raoultii* and *R. slovaca* in *Melophagus ovinus*, the sheep ked. *Parasites Vectors* 9, 600.
- Maa, T.C., 1969. A revised checklist and concise host index of *Hippoboscidae* (Diptera). *Pac. Insects Monogr.* 20, 261–299.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 17, 10–12.
- Megléc, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., Martin, J.F., 2010. Qdd: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinform* 26, 403–404.
- Megléc, E., Pech, N., Gilles, A., Dubut, V., Hingamp, P., Trilles, A., Grenier, R., Martin, J. F., 2014. Qdd version 3.1: a user friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 1302–1313.
- Nartshuk, E.P., Matyukhin, A.V., Shokhrin, V.P., 2022. Parasitic louse flies (Diptera, Hippoboscidae) and their associations with bird hosts in the south of the Russian far East. *Entomol. Rev.* 102, 367–376.
- Oboňa, J., Sychra, O., Greš, S., Heřman, P., Manko, P., Roháček, J., Šestáková, A., Šlapák, J., Hromada, M., 2019. A revised annotated checklist of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) from Slovakia. *ZooKeys* 862, 129–152.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. Genalex 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic selection and research-an update. *Bioinform* 28, 2537–2539.
- Peña-Espinoza, M., Em, D., Shahi-Barogh, B., et al., 2023. Molecular pathogen screening of louse flies (Diptera: Hippoboscidae) from domestic and wild ruminants in Austria. *Parasites Vectors* 16 (179). <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05810-4>.
- Pfeiffer, E., 1905. Ueber trypanosomenähnliche Flagellaten in Darm von *Melophagus ovinus*. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten.* 50, 324–330.
- Powell, W., Mackray, G.C., Provan, J., 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1, 215–222.
- Rani, P., Coleman, G.T., Irwin, P.J., Traub, R.J., 2011. *Hippobosca longipennis* - a potential intermediate host of a species of *Acanthocheilonema* in dogs in northern India. *Parasites Vectors* 4, 143.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BOLD: the Barcode of Life Data System, pp. 355–364. <http://www.barcodinglife.org>. *Mol. Ecol. Notes* 7.
- Regier, Y., Komma, K., Weigel, M., Pulliainen, A.T., Göttig, S., Hain, T., Kempf, V.A.J., 2018. Microbiome Analysis Reveals the Presence of *Bartonella* spp. and *Acinetobacter* spp. in Deer Keds (*Lipoptena cervi*). *Front. Microbiol.* 9, 3100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03100>.
- Rewicz, T., Móra, A., Tończyk, G., Szymczak, A., Grabowski, M., Calleja, E., Perneckner, B., Csabai, Z., 2021. First records raise questions: DNA barcoding of *Odonata* in the middle of the Mediterranean. *Genome* 64, 196–206.
- Riginos, C., Cunningham, C.W., 2005. Inevitable review: local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* × *Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Mol. Ecol.* 14, 381–400.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for windows and linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103–106.
- Szewczyk, T., Werszko, J., Steiner-Bogdaszewska, Z., et al., 2017. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland. *Parasites Vectors* 10, 487. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2413-0>.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W., Wills, D., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538.
- Van Schaik, J., Dekeukeleire, D., Gazaryan, S., Natradze, I., Kerth, G., 2018. Comparative phylogeography of a vulnerable bat and its ectoparasite reveals dispersal of a non-mobile parasite among distinct evolutionarily significant units of the host. *Conserv. Genet.* 19, 481–494.
- Van Schaik, J., Dekeukeleire, D., Kerth, G., 2015. Host and parasite life history interplay to yield divergent population genetic structures in two ectoparasites living on the same bat species. *Mol. Ecol.* 24, 2324–2335.
- Werszko, J., Steiner-Bogdaszewska, Z., Jeżewski, W., Szewczyk, T., Kuryło, G., Wolkowycki, M., Wróblewski, P., Karbowski, G., 2020. Molecular detection of *Trypanosoma* spp. in *Lipoptena cervi* and *Lipoptena fortisetosa* (Diptera: Hippoboscidae) and their potential role in the transmission of pathogens. *Parasitology* 147, 1629–1635.
- Zimin, A.V., Marc, G., Puiu, D., Roberts, M., Salzberg, S.L., James, A., Yorke, J.A., 2013. The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics* 29, 2669–2677.

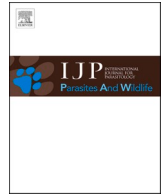
Rozdział II

Janiszewska, A., Rewicz, T., Minias, P., Włodarczyk, R., Kamiński, M., Fiutek, P., Jakubas, D., Rapczyński, J., Remisiewicz, M., Sztwiertnia, H., Bartos, M., 2025. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 27, Article 101081.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2025.101081>














Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijppaw

Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)

Aleksandra Janiszewska^{a,*} , Tomasz Rewicz^b , Piotr Minias^a , Radosław Włodarczyk^a ,
Maciej Kamiński^a , Patryk Fiutek^c , Dariusz Jakubas^d , Jan Rapczyński^e ,
Magdalena Remisiewicz^f , Hanna Sztwiertnia^g , Maciej Bartos^{a,**} 

^a University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Biodiversity Studies and Bioeducation, Banacha 1/3, 90-237, Lodz, Poland

^b University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Invertebrate Zoology and Hydrobiology, Banacha 12/16, 90-237, Lodz, Poland

^c Wojska Polskiego 32, Przybyszów, 42-310, Poland

^d Department of Vertebrate Ecology and Zoology, Faculty of Biology, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, 80-309, Gdansk, Poland

^e Forestry Student Scientific Association, Ornithological Section, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 166, 02-787, Warszawa, Poland

^f University of Gdańsk, Faculty of Biology, Bird Migration Research Station, Wita Stwosza 59, 80-308, Gdansk, Poland

^g Silesian Ornithological Society, Sienkiewicza 21, 50-335, Wrocław, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Birds
Ectoparasites
Avian parasites
Microsatellite markers
Louse flies
Ornithomya avicularia
Hippoboscidae

ABSTRACT

Ectoparasites play a key role in ecosystems, affecting the health, behaviour, and reproductive success of their hosts. The parasite-host relationships are complex and dynamic, and selective pressures exerted by the hosts can lead to local adaptations and changes in the genetic structure of the parasite population. Our aim was to investigate how parasitism on a diverse range of avian hosts with varying ecology and habitat preferences shapes the genetic variation of the parasite. For this purpose, we quantified the genetic structure and differentiation of host-related populations of a common polyxenic avian ectoparasite *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae, Ornithomyiinae), a louse fly species parasitizing various bird species occupying diverse ecological niches. Using 20 polymorphic microsatellite markers, we genotyped louse flies collected from four phylogenetically (passerine and non-passerine) and ecologically (wetland vs. forest) divergent avian hosts caught during autumn migration. Despite the ecological and phylogenetic differences among hosts, the genetic differentiation among louse fly populations was modest, indicating ongoing gene flow. Bayesian clustering and discriminant analysis identified two genetic clusters with relatively weak barriers to gene flow, but this clustering reflected neither phylogenetic nor ecological differences between hosts. We suggest that the high dispersal abilities and the specific reproductive strategy of *O. avicularia* likely contribute to the genetic homogeneity of its populations across ecologically and phylogenetically distant hosts. This study provides novel insights into the population genetics of an understudied ectoparasite, with implications for understanding host-parasite interactions and disease transmission in avian systems.

1. Background

In the complex relationships between parasites and their hosts, parasites strive to optimize their ability to infect and spread, while hosts develop strategies to avoid parasitic exploitation (Buckingham and Ashby, 2022). This coevolutionary arms race between parasites and hosts is considered one of the major forces generating biological diversity (Hall et al., 2011). At the early stages of evolving parasitic

lifestyle, parasites are usually associated with many different host species and lack anatomical or physiological specialization (Veiga et al., 2019; Lei et al., 2024). However, long-term coevolution often leads to the development of advanced mechanisms and structures that allow more efficient exploitation of a narrow group of hosts (Spottiswoode and Stevens, 2012; Castillo et al., 2022). This tendency of parasites to specialise on their hosts through extensive adaptations to their ecology, behaviour, and defence mechanisms (van Dobben, 1952; Phares, 1995;

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: aleksandra.janiszevska2@edu.uni.lodz.pl (A. Janiszewska), maciej.bartos@biol.uni.lodz.pl (M. Bartos).

<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2025.101081>

Received 4 April 2025; Received in revised form 10 May 2025; Accepted 11 May 2025

Available online 12 May 2025

2213-2244/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Henry et al., 2009; Helluy, 2013) may be evolutionarily driven by greater cost characteristic for generalist parasitic strategies (Combes, 1999; Regoes et al., 2000). The level of parasite specialization has profound consequences for the genetic diversity of parasites, causing local adaptations (Kawecki and Ebert, 2004), ecological host-fitting (Pérez et al., 2019), and host immunity effectiveness reduction (Ekroth et al., 2019; Gibson and Nguyen, 2021).

A wide array of factors can affect the genetic structure of parasite populations, including the level of host specificity, effective population size, geographic separation between populations, host dispersal capacity, evolutionary history of parasites, host population structures, and life cycle complexity (Nadler, 1995; Criscione et al., 2005; Huyse et al., 2005). Host vagility plays a significant role in facilitating gene flow between parasite sub-populations, therefore higher genetic diversity is frequently observed in polyxenous parasites found on mobile hosts (Matthee, 2020; Araya-Anchetta et al., 2015), while specialist parasites are often characterised by stronger genetic differentiation and lower genetic diversity (Blouin et al., 1995; Blasco-Costa et al., 2012).

Ectoparasites represent one of the most dispersive parasitic groups. Arthropod ectoparasites that retain locomotory structures (e.g. legs of wings) throughout their entire adult life may easily change hosts. These parasites may interact with their hosts only periodically (Dejene et al., 2020) mainly to obtain nourishment (e.g. haemolymph, blood, hairs, feathers, body secretions) from the skin surface of the host (Parveen et al., 2020).

Louse flies (Diptera: Hippoboscidae) are hematophagous temporary ectoparasites of homeothermic animals. Currently, 213 species have been described, most of which feed on avian blood (Dick, 2006). Among louse flies Ornithomyiinae are avian parasites (171 species), Lipopteninae parasitize mammals (34 species), while Hippoboscinae are generalists found on birds and mammals (Dick, 2006). Transmission of avian louse flies most often occurs in the nest, where puparia typically overwinter and, after metamorphosis in the spring, the imago infects adult birds and their nestlings. Later during summer and autumn, imagines spread through host dispersal. Louse flies can actively change their hosts, but dispersal among hosts should mostly occur when birds aggregate locally, e.g. during communal feeding and roosting at migration stopover sites (Nartshuk et al., 2022; Santolíkova et al., 2022; Keve et al., 2024).

Ornithomya avicularia is one of the most widely distributed European louse flies found on, at least, 65 avian taxa (Maa, 1969). Like other members of the genus *Ornithomya*, it is an active flier with well-developed wings, which enhances active dispersal among hosts (Borowiec, 1984). *Ornithomya avicularia*, similarly to other louse flies uses larviparous development, where a single larva develops in the female uterus and, after reaching maturity, is released as a prepupa, which immediately starts to pupate. The metamorphosis to the imago takes 20–50 days (Hutson, 1984), but in low temperatures, the pupal stadium can last up to 10 months (Baker, 1967). The species is most commonly recorded in lowlands with more enclosed vegetation (Hutson, 1984). Recent studies show that *O. avicularia* prefers to parasitize on bird hosts breeding in open nests on trees (Lehikoinen et al., 2021).

The aim of this study was to investigate population genetic structure and differentiation of *O. avicularia* from different avian hosts during the autumn migration. We hypothesized that genetic differentiation patterns of *O. avicularia* should reflect either phylogenetic or ecological differentiation of its hosts. To test these hypotheses, we collected *O. avicularia* louse flies from four phylogenetically and ecologically divergent groups of host species. In order to effectively separate the effects of host phylogeny and ecology (habitat), in our analyses we concentrated on two non-passerine birds, the common snipe *Gallinago gallinago* (associated with wetland habitats) and long-eared owl *Asio otus* (usually found in forest habitats), as well as passerine (Passeriformes) species that are associated with similar habitats, i.e. two warblers species from the *Acrocephalus* genus (wetlands) and Eurasian blackbird *Turdus merula* (forests). We expected that the lowest genetic

differentiation of *O. avicularia* may be detected either between closely related host species associated with different habitats or between phylogenetically-distant hosts from similar habitats, i.e. supporting the key role of either host phylogeny or ecology in parasite dispersal and gene flow. Genetic differentiation of louse flies between host populations was quantified with a panel of polymorphic microsatellite markers developed for the *Ornithomya* genus (Janiszewska et al., 2023).

2. Methods

2.1. Study sites and material collection

Louse flies were collected between 2018 and 2022 during the period of autumn bird migration (end of July to the mid-November). Sampling sites were located at the southern (Polish) coast of the Baltic Sea (Vistula Spit, Bukowo Reservoir), in the Żuławy Alluvial Plain in North Poland (Drużno Lake), lowlands of Central Poland (Rakutowskie Lake; Jezioro Reservoir and middlestream of Vistula), and uplands in the central part of the Sudetes mountain in Southern Poland (Bukówka Reservoir) (Fig. 1). Birds were captured during long-term bird ringing schemes with mist nets and tunnel traps. Each captured bird was weighed, measured, and aged in accordance with traditional protocols for bird ringing. Upon capture, wing and body feathers were carefully examined to check for the presence of louse flies. The flies were collected manually (one per bird) and preserved in 96 % ethanol. All collected flies were identified under a stereomicroscope, according to Borowiec (1984) and Hutson (1984). This study focused on a single polyxenous louse fly species, *Ornithomya avicularia*. To investigate the genetic structure of *O. avicularia* populations occurring at ecologically and phylogenetically different hosts the study focused on specimens collected from four types of hosts: i) common snipe (Charadriiformes, Scolopacidae), ii) long-eared owl (Strigiformes, Strigidae), iii) *Acrocephalus* reed warblers (great reed warbler *A. arundinaceus* and common reed warbler *A. scirpaceus*; Passeriformes, Acrocephalidae, analysed together due to close phylogenetic relatedness and ecological similarity), and iv) Eurasian blackbird (Passeriformes, Turdidae). All these bird species were among the most common hosts of *O. avicularia*, allowing us to collect samples of expected size (>20 specimens per host). We collected much lower samples of *O. avicularia* (<15 specimens) from all the other captured bird species and, thus, they were not included in the study. In total, 95 specimens of *O. avicularia* were included in the molecular analyses (22–25 per host). DNA was extracted from biological material (two to three legs per louse fly) using the Bio-Trace DNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland). The analyses generally followed the protocol provided by the manufacturer, although the time of tissue lysis incubation was extended to 72 h (Janiszewska et al., 2023).

2.2. Microsatellite genotyping

Genotyping included 20 di- and trinucleotide polymorphic microsatellite markers previously developed for the *Ornithomya* louse flies (Janiszewska et al., 2023). All PCR amplifications were conducted in a total volume of 20 µL containing 10 µL DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), 4.8 µL ultrapure sterile water (Thermo Scientific Inc., Waltham, USA), 1.6 µL–50 µM concentrated forward and reverse primers, and 2 µL DNA extract with concentration not lower than 10 ng/µL. All PCR amplifications followed protocols described previously by Janiszewska et al. (2023). All amplifications were checked on 2 % agarose gels. No multiplexing was conducted in the amplification procedures. Microsatellite genotyping was conducted by Genomed (Warsaw, Poland) using 6-FAM fluorescent dye and allele sizes were scored against GeneScan TM 600 LIZ Standard (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) in Geneious v.11.1.5 software (Kearse et al., 2012). Unsuccessful amplifications were determined from three attempts per sample. The final amplification rate was 96.42 ± 4.10 (SD) % of samples across all markers.

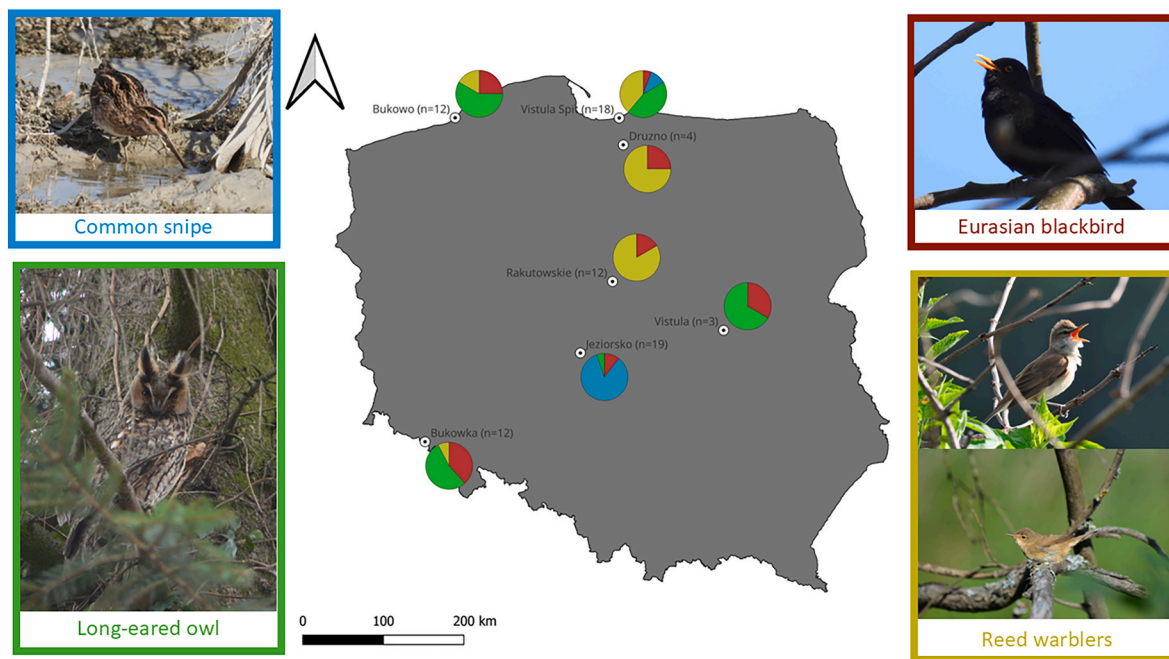


Fig. 1. Map of Poland with sampling sites for *Ornithomya avicularia*. Relative frequencies of avian hosts at each sampling site are shown with pie charts, where red – common blackbird, blue – common snipe, green – long-eared owl, yellow – reed warblers.

To estimate the frequency of null alleles, methods developed by Brookfield (1996), were used as implemented in Micro-Checker v.2.2.3 software (Van Oosterhout et al., 2004). Two (OrAv7 and OrAv23) out of 20 polymorphic markers showed strong signature of null alleles (>0.15), and they were excluded from downstream analyses. All the remaining markers showed little evidence for null alleles. Micro-Checker provided no evidence for other genotyping errors due to short allele dominance (large allele dropout). However, a problem of stuttering scoring errors was detected in one marker (OrAv17), which was also excluded from further analyses. For the remaining 17 microsatellite markers, deviation of observed allele frequencies from Hardy-Weinberg equilibrium was investigated using chi-square tests, as implemented in GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2006), while FStat 2.9.4 software (Goudet, 1995) was used to test for linkage disequilibrium. No evidence was found for either significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium or linkage disequilibrium between the markers (as tested with Bonferroni correction for multiple comparisons). Hence, 17 markers were retained in the final dataset. The number of alleles varied between 3 and 14 per marker, and high mean polymorphism information content (PIC = 0.656) across the markers was found, as calculated in Cervus v.3.0.7 (Kalinowski et al., 2007).

2.3. Genetic diversity

GeneAlEx 6.5 was used to estimate the following measures of allelic diversity: mean allelic richness (N_a), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity, and inbreeding coefficient (F_{IS}). Analysis of variance (ANOVA) was used to test for differences in the mean multilocus heterozygosity (response variable) between louse flies from different host taxa (independent variable). Additionally, a general linear mixed model (GLMM) was used to test for variation in the mean allelic richness (response variable) among louse flies from various host taxa (independent variable). Here, locus identity was entered as a random factor in the model. All these analyses were run in Statistica 13.3.0 software (TIBCO Software Inc, Palo Alto, USA).

2.4. Genetic differentiation and structure

Two complimentary measures were used to quantify genetic differentiation of louse flies between the hosts. First, traditional pairwise fixation indices (F_{ST}) were calculated following Weir and Cockerham (1984). Second, Jost's D measure of differentiation (henceforth referred to as D_{est}) was computed, which is based on the effective number of alleles rather than predicted heterozygosity (Jost, 2008). Both F_{ST} and D_{est} estimates were calculated and tested for significance in GenAlEx (Peakall and Smouse, 2006).

Next, genetic structure of louse fly populations from different hosts was investigated using two clustering approaches, which aimed to probabilistically divide and assign individual louse flies into K genetic groups (clusters) based on their multilocus microsatellite genotypes. First, Bayesian clustering algorithm implemented in STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003, 2007) was used. The number of tested K ranged between one and four (consistent with the number of host types). The correlation model of allele frequencies and the admixture model of ancestry were used. The length of burn-in period was set to 1000, which was followed by 5000 Markov chain Monte Carlo iterations. To choose the optimal K, two alternative measures were used, i.e. the ln-transformed probability of the data ($\ln Pr(X|K)$) (Pritchard et al., 2000) and ΔK measure developed by Evanno et al. (2005), although the latter fails to effectively evaluate scenario of $K = 1$ (Janes et al., 2017). The output was summarized and visualized using Clumpak (Kopelman et al., 2015). Apart from the STRUCTURE analysis, genetic clustering using Discriminant Analysis on Principal Components (DAPC) was performed on multilocus microsatellite genotype data, as implemented in the *adegenet* package (Jombart et al., 2010) in R statistical environment (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). This analysis firstly transforms the data using Principal Components Analysis (PCA), and then performs a Discriminant Analysis on the retained principal components (Jombart et al., 2010). The optimal number of principal components ($n = 47$ PCs) was selected based on the maximum α -score using the *optim.a.score* function. The first two discriminant functions were used to assign all individuals to their prior groups (i.e. host types) and the results of DAPC clustering was visualized using the *scatter.dapc* function. Eigenvalues were used to quantify the

ratio of the variance between groups (hosts) over the variance within groups for each discriminant function.

3. Results

The level of polymorphism was similar between louse fly populations occurring at different avian hosts. The mean allelic richness was 6.9 per locus across all populations (Table 1), and ranged from 6.71 (flies from long-eared owls) to 7.11 (flies from common snipe) per population, showing no significant differences between flies from different hosts (ANOVA, $F_{3,64} = 0.37$, $p = 0.773$). The mean observed heterozygosity was 0.642 across all loci (Table 1). Similarly to allelic richness, we did not find any significant differences in observed heterozygosity between louse fly populations from different avian host (GLMM, $F_{3,91} = 1.29$, $p = 0.283$). The mean F_{is} was 0.12 per population, providing no evidence for strong inbreeding (Table 1).

The two estimators, i.e. fixation index (F_{ST}) and Jost's D (D_{est}), revealed similar patterns of genetic differentiation between louse fly populations from different avian hosts. The highest genetic differentiation ($F_{ST} = 0.017$, $p = 0.011$; $D_{est} = 0.025$, $p = 0.001$) was found between fly populations from common snipe and reed warblers (Table 2). Significant pairwise differentiation was also found between louse flies from long-eared owls and both passerine hosts, i.e. reed warblers ($F_{ST} = 0.015$, $p = 0.012$; $D_{est} = 0.019$, $p = 0.035$) and blackbirds ($F_{ST} = 0.017$, $p = 0.032$; $D_{est} = 0.018$, $p = 0.012$). The lowest (non-significant) differentiation was found between fly populations from blackbirds and common snipes (Table 2).

We found evidence for the presence of two genetic clusters in our dataset, as indicated by the highest $\Delta K = 19.04$ and the highest posterior probability $\ln P(K) = -4841.23$ (Fig. 2) in the STRUCTURE analysis. All populations of louse flies (from all host types) contained individuals from one cluster (marked in blue in Fig. 2), suggesting that the overall degree of population isolation was modest. Individuals assigned to the second cluster (marked in orange on Fig. 2) were primarily detected in the common snipe and blackbirds, suggesting that these two avian species may host louse flies from a genetically distinct population. The DAPC clustering revealed roughly similar genetic structure to the one inferred from the STRUCTURE analysis. Particularly, louse flies from reed warblers and long-eared owls clustered together and showed lower degree of clustering with louse flies from both common snipes and blackbirds (Fig. 3). Separation of warbler and owl clusters from snipe and blackbird clusters was particularly well visible along the axis representing the first discriminant function DF1 (Fig. 3), which explained most between-host genetic variance in our data (eigenvalues: 87.69 vs. 62.80 for DF1 and DF2, respectively).

4. Discussion

In this study, the genetic structure of four host-related populations of *O. avicularia*, a polyxenous louse fly parasitizing phylogenetically divergent birds that occupy different ecological niches, was investigated. Our results mostly did not support our predictions, as no convincing evidence for genetic differentiation of *O. avicularia* with respect to either host phylogeny or ecology (habitat) were found. Instead, the lowest genetic differentiation was found between

Table 2

Pairwise estimates of genetic differentiation between louse fly populations from different avian host species. Genetic differentiation was measured with F_{ST} (below diagonal) and Jost's D_{est} (above diagonal), significant ($\alpha \geq 0.015$) values are bolded.

Host type	Common snipe	Long-eared owl	Reed warblers	Eurasian blackbird
Common snipe	–	0.008	0.025	0.003
Long-eared owl	0.013	–	0.018	0.019
Reed warblers	0.017	0.015	–	0.014
Eurasian blackbird	0.013	0.017	0.016	–

Significance refers to differences between louse fly populations from different avian host species.

phylogenetically and ecologically distant hosts (i.e. common snipe and Eurasian blackbird). At the same time, the overall degree of population differentiation was modest, which indicates a relatively strong and ongoing gene flow among the host-related parasite populations. The pattern is in agreement with high dispersal abilities of louse flies and can be facilitated by some ecologically relevant traits of their hosts, such as social behaviour, foraging modes, feather grooming frequency and/or breeding strategy.

There are several characteristics of *O. avicularia*, also shared by other members of the genus *Ornithomya*, which may facilitate gene flow between louse fly populations parasitizing different hosts. The most apparent morphological feature supporting effective dispersal in all the species of the genus is the presence of well-developed wings, which are retained throughout adult life. In contrast to some other louse flies, such as *Lipoptena*, the wings in *Ornithomya* are not discarded after finding the host, which enables the flies to actively change hosts several times in their lifetime, including changes between individuals of the same or different host species (Borowiec, 1984). Although wings facilitate transmission, they also increase the risk of being noticed and captured by the host, since active movement reduces the effective concealment among host feathers. On the other hand, shedding wings hinders transmission, but it may increase survival probability. For these reasons, stenoptery and wing shedding are common among more specialized louse flies associated with birds and mammals that breed in colonies or live in dense social groups, such as swifts, swallows, bats and ungulates (Andersen, 1997; Petersen et al., 2007). *Ornithomya avicularia*, as an effective polyxenous parasite, has abilities to infect solitary host species and high mobility through active flight may reflect an adaptation for low host density. The studied host species during the breeding season are territorial, with varying degrees of population densities. The Eurasian blackbird reaches high local densities, especially in urban areas, while common snipe and long-eared owl are more solitary and tend to breed at low densities. Reed warblers, in suitable habitats show moderate densities. The studied host species exhibit diverse migratory strategies, but none of the species migrates in tight, coordinated flocks. They travel individually or in small numbers, which may reduce their exposure to parasites relying on host aggregations during migration. A prolonged offspring production extended to the out-of-the-nest stage may further promote infection and active dispersal among different host species. Adult *O. avicularia* attach to and move around with their hosts from the

Table 1

Polymorphism of 17 microsatellite markers used to analyse population genetics in *Ornithomya avicularia*. Na – number of alleles; Ho – observed heterozygosity; He – expected heterozygosity.

Host type	Na	Ho	He	Fis
Common snipe	7.12 ± 0.64	0.63 ± 0.05	0.67 ± 0.04	0.154 ± 0.21
Long-eared owl	6.71 ± 0.68	0.66 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.062 ± 0.22
Reed warblers	7.00 ± 0.51	0.71 ± 0.05	0.66 ± 0.04	0.025 ± 0.27
Eurasian blackbird	6.89 ± 0.59	0.58 ± 0.05	0.69 ± 0.04	0.219 ± 0.23
All hosts	6.926 ± 0.298	0.642 ± 0.026	0.665 ± 0.021	0.115 ± 0.088

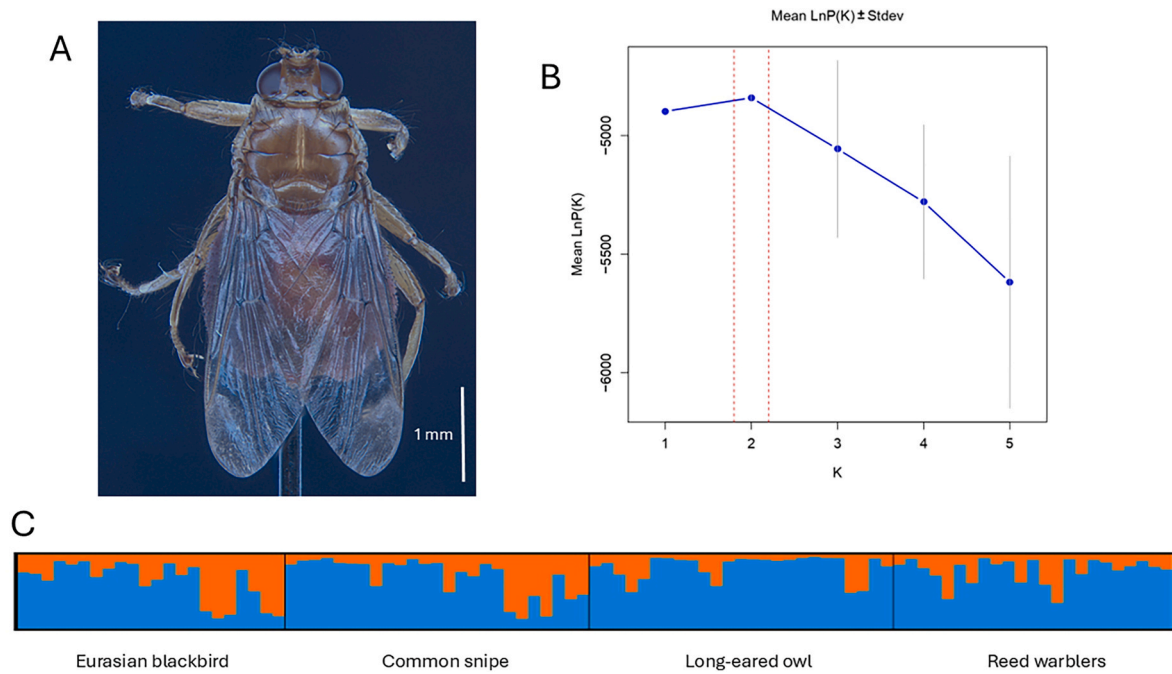


Fig. 2. Bayesian assignment of *Ornithomya avicularia* from four populations occurring at different avian hosts to genetic clusters. Each bar at the assignment plot (C) represents the estimated proportional posterior probability of each individual belonging to each of two inferred genetic clusters, as marked with different colours (blue and orange). Genetic clusters were inferred for seventeen microsatellite markers and ln-transformed probability for different number of clusters (K) is shown in the B panel.

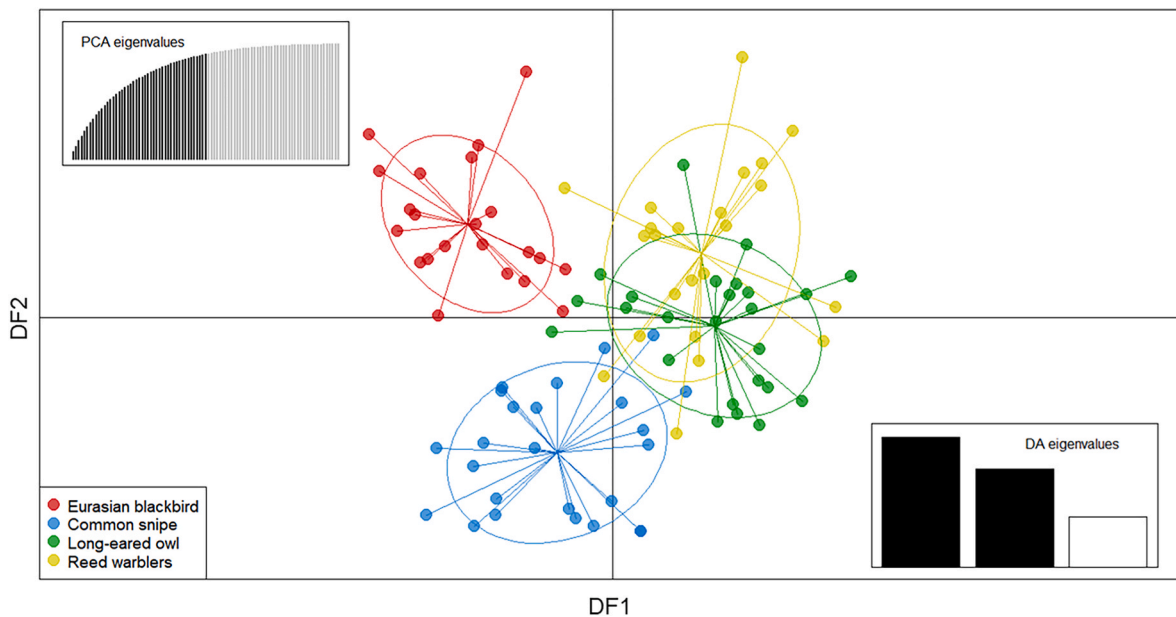


Fig. 3. Genetic clustering by the Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) for four *Ornithomya avicularia* populations occurring at different avian hosts: Eurasian blackbird *Turdus merula*, common snipe *Gallinago gallinago*, long-eared owl *Asio otus*, and *Acrocephalus* warblers (i.e. great reed warbler *A. arundinaceus* and common reed warbler *A. scirpaceus*). Individuals of *Ornithomya avicularia* are shown as dots and the avian host species as inertia ellipses (marked with a different colour). Two discriminant functions (DF1 and DF2) explaining most between-host genetic variance in the data are shown. Eigenvalues of principal components and discriminant functions used in the analysis are displayed in upper left and bottom right insets, respectively.

late spring, when birds are on the breeding grounds. Importantly, flies also maintain attachment to their hosts during the autumn bird migration, at least until early November (MB, pers. obs.). For this entire period, *O. avicularia* flies produce puparia and drop them to the ground along the avian migratory flyways. Hence, it is likely that the flies hatching in spring and actively searching for new hosts will encounter a different host from the one infested by the female that produced the

puparium. Considering all this, the high mobility of adult individuals through active flight, as well as the prolonged egg production period combined with their deposition across various environments, may contribute to increased gene flow between louse populations associated with different hosts. This suggestion is consistent with our results. The ability of parasites to move between hosts appears to play a crucial role in shaping their genetic structure and driving either genetic

homogenization or local specialization. The findings of Gustafsson and Olsson (2012) suggested that the homogenization of wing lice (genus *Lunaceps*) assemblages parasitizing sandpipers and stints (Charadriiformes) was dependent on the high ability to move between hosts in mixed shorebird flocks along migratory routes. In contrast, the hen flea *Ceratophyllus gallinae* parasitizing great tits *Parus major* and collared flycatchers *Ficedula albicollis* showed host-related genetic differentiation, suggesting local specialization that may limit gene flow between the subpopulations (Appelgren et al., 2018). Similarly, studies on *Ixodes uriae* ticks have shown that different tick races associated with different seabird species have distinct genetic structure, suggesting limited gene flow between races and indicating host-specific parasite dispersal (McCoy et al., 2003).

Our study hosts are characterized by distinct ecological traits, including habitat requirements and migration strategies. Surprisingly, the most genetically similar louse fly populations originated from the common snipes and Eurasian blackbirds – a pair of species with divergent ecological niches and phylogenetic relatedness. In general, Eurasian blackbirds inhabit forest areas, ranging from natural deciduous forests to urban parks, where they spend the breeding season and which they also prefer to explore at stopovers during migration. In contrast, common snipes are inland waders inhabiting wetlands and marshlands with well-developed ground vegetation, river valleys, swampy meadows, and tundra. Snipes can also breed in forested habitats, such as taiga. At the same time, geographical ranges of both species partially overlap in Central and Northern Europe, but snipes breed generally much farther to the East in comparison to blackbirds (del Hoyo et al., 1996; 2005). Although both species migrate along slightly different routes, their traditional flyways overlap extensively in Central Europe (Van Vliet et al., 2009; Minias et al., 2010; Spina et al., 2022). Given all this, dispersal of louse flies between these divergent hosts may possibly occur along the migratory routes and may be explained by high mobility of flies that actively search for a host across a mosaic of different habitats. In fact, both host species may co-occur in similar habitats at some stopover sites, for example at Druzno Lake blackbirds roosted in bush and reedbeds with mud patches, where common snipes were also occasionally observed. Hence, direct transmission of adult louse flies between these hosts cannot be ruled out. It is also possible that in Central Europe, autumn migration may facilitate the convergence of blackbird and snipe populations originating from distinct geographical regions, thereby enabling cross-infestation with louse flies representing different genetic lineages. The location and timing of blackbird and snipe captures do not indicate that the individuals of each species originated from different European populations.

Overall, relatively low host-related genetic differentiation of the studied louse fly populations may be the result of balancing selection, where parasites evolve adaptations being effective across a broad spectrum of hosts from different environments (Tellier et al., 2014). Alternatively, the expansion of parasites across ecologically and phylogenetically distant host species may occur via a pre-existing general adaptation, without the need for increased differentiation and local adaptation (Shaw et al., 2021). Finally, it is possible that genetic isolation between different host-related populations of *O. avicularia* is effective, but the time of this isolation was too short to generate strong genetic differentiation. The rate of genetic change in parasites depends on their life cycle, reproductive strategy, and environmental selection pressures (Poulin, 2007). In parasites with simple life cycles and short generations, genetic differences between populations may arise more quickly (Nadler, 1995). In more ecologically complex parasites, on the other hand, the rate of change may be slower due to longer life cycles (Prugnolle et al., 2005). In addition, selection pressures related to the host or environment may significantly accelerate differentiation between parasite populations (Louhi et al., 2010). There is little information about the evolutionary history of the louse flies. However, Van Schaik et al. (2018) have shown a discordant genetic pattern between *Basilia nana* bat fly (Nycteribiidae) and its host, the Bechstein's bat

Myotis bechsteini. The authors showed that despite the long genetic isolation of different host subpopulations, the parasite effectively disperse between them, possibly via secondary host species. Our study reinforces the conclusion that genetic structure of ectoparasite populations may not necessarily reflect genetic (or phylogenetic) structure of host taxa.

The results of our research, indicating the high mobility of *O. avicularia*, may have important epidemiological implications, given that this louse fly is a known vector of various pathogens, including *Trypanosoma avium* (Baker, 1967), *Babesia* spp., *Wolbachia* spp. (Čisovská Bazsalovicsová, 2023), and Avipoxvirus (APV) (Wawman et al., 2025). The louse fly ability to move between hosts (both within and across species) suggests a potential role in the transmission of multi-host pathogens. This is particularly concerning in light of ongoing louse fly range shifts partially attributed to climate change (Wawman, 2025). Such shifts may increase the likelihood of parasite switching to novel hosts, thereby facilitating pathogen spread and creating new epidemiological threats. In this context, polyxenous ectoparasites of migratory birds, such as *O. avicularia*, are of particular concern, as they may serve as conduits for pathogen transmission between previously unconnected host populations. These findings highlight the need for increased surveillance and monitoring, especially as climate change continues to alter avian migratory strategies and the ecological dynamics of host-parasite interactions.

5. Conclusions

Our study provides novel molecular insights into the complex host-ectoparasite system involving one of the most widespread louse flies species and its diverse bird hosts. By using microsatellite markers we investigated the host-related genetic structure of *O. avicularia* contributing to the relatively modest body of research focusing on the population genetics of louse flies. Our findings have implications for understanding host-parasite dynamics in mobile generalist ectoparasites. The relatively low genetic differentiation of *O. avicularia* populations across phylogenetically and ecologically distinct hosts suggests that high dispersal ability and weak host fidelity can override the isolating effects of host divergence. These results undermine the assumption that *O. avicularia* population genetic structure necessarily mirrors that of their hosts. Our study, demonstrating the high mobility of *O. avicularia* and its broad host range, also suggests that this species may gain increasing epidemiological significance as a vector of pathogens, particularly in the context of its ongoing range shifts.

CRediT authorship contribution statement

Aleksandra Janiszewska: Writing – original draft, Visualization, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Tomasz Rewicz:** Writing – review & editing, Methodology, Data curation. **Piotr Minias:** Writing – review & editing, Resources, Investigation, Data curation, Conceptualization. **Radosław Włodarczyk:** Writing – review & editing, Resources, Investigation. **Maciej Kamiński:** Writing – review & editing, Resources, Investigation. **Patryk Fiutek:** Writing – review & editing, Resources, Investigation. **Dariusz Jakubas:** Writing – review & editing, Resources, Investigation. **Jan Rapczyński:** Writing – review & editing, Resources, Investigation. **Magdalena Remisiewicz:** Writing – review & editing, Resources, Investigation. **Hanna Sztwiertnia:** Writing – review & editing, Resources, Investigation. **Maciej Bartos:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Investigation, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper. The research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to all the volunteers who contributed their time and effort to the data collection. We especially thank volunteer bird ringers, including Tomasz Iciek, Anna Piasecka, Brygida Manikowska-Ślepowrońska, Zuzanna Pestka, Krzysztof Stepniewski, Marta Witkowska and Maciej Wayda for their invaluable assistance and dedication throughout the research. We would also like to thank Iwona Filanowska for providing the photos of great reed warbler.

The bird capturing was carried out with the consent of the General Directorate for Environmental Protection in Poland. The work at the Jeziorsko nature reserve was carried out with the consent of the Regional Directorate for Environmental Protection in Łódź. The work at Drużno Lake reserve was performed with the permissions from the Regional Directorate of Environmental Protection in Olsztyn. Fieldwork at the Operation Baltic stations was conducted with the relevant permits from the General Directorate for Environmental Protection, Poland, and the Marine Offices in Gdynia and Szczecin, and with funding from the the Ministry of Education and Science (Poland) as the Special Research Facility grant (SPUB) from the Bird Migration Research Station, University of Gdansk, Poland. The fieldwork at Bukówka Reservoir was conducted with the permits from State Water Management Polish Waters, Poland.

References

- Andersen, N.M., 1997. Phylogenetic tests of evolutionary scenarios: the evolution of flightlessness and wing polymorphism in insects. *Mem. Mus. Natl. Hist. Nat.* 173, 91–108.
- Appelgren, A.S.C., Saladin, V., Richner, H., et al., 2018. Gene flow and adaptive potential in a generalist ectoparasite. *BMC Evol. Biol.* 18, 99. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1205-2>.
- Araya-Anchetta, A., Busch, J.D., Scoles, G.A., Wagner, D.M., 2015. Thirty years of tick population genetics: a comprehensive review. *Infect. Genet. Evol.* 29, 164–179. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.008>.
- Baker, J.R., 1967. A review of the role played by the Hippoboscidae (Diptera) as vectors of endoparasites. *J. Parasitol.* 53, 412–418. <https://doi.org/10.2307/3276603>.
- Blasco-Costa, I., Waters, J.M., Poulin, R., 2012. Swimming against the current: genetic structure, host mobility, and the drift paradox in trematode parasites. *Mol. Ecol.* 21, 207–217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05374.x>.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B., 1995. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141, 1007–1014. <https://doi.org/10.1093/genetics/141.3.1007>.
- Borowiec, L., 1984. *Klucz Do Oznaczenia Owadów Polski. Część XXVIII: Muchówki – Diptera. Zeszyt 77. Wpłeszczowate – Hippoboscidae.* PWN, Warszawa.
- Brookfield, J.F., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.* 5, 453–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00336.x>.
- Buckingham, L.J., Ashby, B., 2022. Coevolutionary theory of hosts and parasites. *J. Evol. Biol.* 35, 205–224. <https://doi.org/10.1111/jeb.13981>.
- Castillo, R., Wurdack, M., Pauli, T., et al., 2022. Evidence for a chemical arms race between cuckoo wasps of the genus *Hedychrum* and their distantly related host apoid wasps. *BMC Evol. Biol.* 22, 138. <https://doi.org/10.1186/s12862-022-02093-8>.
- Čisovská Bazsalovicsová, E., Vichová, B., Oboňa, J., Radačovská, A., Blažeková, V., Králová-Hromadová, I., 2023. Bird louse flies *Ornithomya* spp. (Diptera: Hippoboscidae) as potential vectors of mammalian Babesia and other pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 23, 275–283. <https://doi.org/10.1089/vbz.2022.0088>.
- Criscione, C.D., Poulin, R., Blouin, M.S., 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol. Ecol.* 14, 2247–2257.
- Dejene, D., Andarge, B., Hiko, A., 2020. Review on ectoparasites and tick-borne hemoparasites in small ruminants. *Am. Eurasian J. Sci. Res.* 15 (3), 89–100. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejr.2020.89.100>.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., 1996. *In: Handbook of the Birds of the World*, vol. 3. Lynx Edicions, Barcelona, p. 496. Hoatzin to Auks.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Christie, D.A., 2005. *In: Handbook of the Birds of the World*, vol. 10. Lynx Edicions, Barcelona, pp. 645–646. Cuckoo-shrikes to Thrushes.
- Dick, C.W., 2006. Checklist of world Hippoboscidae (Diptera: hippoboscoidea). *Field Mus. Nat. Hist.* 1–7.
- Ekroth, A.K.E., Rafaluk-Mohr, C., King, K.C., 2019. Host genetic diversity limits parasite success beyond agricultural systems: a meta-analysis. *Proc. R. Soc. A B* 286, 20191811. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1811>.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure: extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567–1587. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes* 7, 574–578. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>.
- Gibson, A.K., Nguyen, A.E., 2021. Does genetic diversity protect host populations from parasites? A meta-analysis across natural and agricultural systems. *Evol. Lett.* 5, 16–32. <https://doi.org/10.1002/evl3.206>.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86, 485–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>.
- Gustafsson, D.R., Olsson, U., 2012. Flyway homogenisation or differentiation? Insights from the phylogeny of the sandpiper (Charadriiformes: Scolopacidae: Calidrinae) wing louse genus *Lunaceps* (Phthiraptera: ischnocera). *International J. Parasitol.* 42, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.11.003>.
- Hall, A.R., Scanlan, P.D., Morgan, A.D., Buckling, A., 2011. Host–parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection. *Ecol. Lett.* 14, 635–642. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01624.x>.
- Helluy, S., 2013. Parasite-induced alterations of sensorimotor pathways in gammarids: collateral damage of neuroinflammation? *J. Exp. Biol.* 216, 67–77. <https://doi.org/10.1242/jeb.073213>.
- Henry, L.M., Ma, B.O., Roitberg, B.D., 2009. Size-mediated adaptive foraging: a host-selection strategy for insect parasitoids. *Oecologia* 161, 433–445. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1381-2>.
- Hutson, A.M., 1984. *Diptera: Keds, Flat-Flies and Bat-Flies (Hippoboscidae and Nycteribiidae).* Royal Entomological Society of London, London, pp. 4–5.
- Huysse, T., Poulin, R., Théron, A., 2005. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends Parasitol.* 21, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.009>.
- Janes, J.K., Miller, J.M., Dupuis, J.R., Malenfant, R.M., Gorrell, J.C., Cullingham, C.J., Andrew, R.L., 2017. The K=2 conundrum. *Mol. Ecol.* 26, 3594–3602.
- Janiszewska, A., Bartos, M., Trębicki, E., Remisiewicz, M., Cierlik, G., Minias, P., Rewicz, T., 2023. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies. *Exp. Parasitol.* 255, 108652. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108652>.
- Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 11, 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>.
- Jost, L., 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol. Ecol.* 17, 4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>.
- Kawecki, T.J., Ebert, D., 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7, 1225–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- Keve, G., Csörgő, T., Kovács, D., et al., 2024. Contributions to our knowledge on avian louse flies (*Hippoboscidae: Ornithomyiinae*) with the first European record of the African species *Ornithoctona laticornis*. *Parasites Vectors* 17, 237. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06303-8>.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N., Mayrose, I., 2015. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>.
- Lehikoinen, A., Pohjola, P., Valkama, J., Mutanen, M., Pohjoismäki, J.L.O., 2021. Promiscuous specialists: host specificity patterns among generalist louse flies. *PLoS One* 16, e0247698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247698>.
- Lei, H.P., Jakovlić, I., Zhou, S., et al., 2024. Geography, phylogeny and host switch drive the coevolution of parasitic *Gyrodactylus* flatworms and their hosts. *Parasites Vectors* 17, 42. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06111-6>.
- Louhi, K.-R., Karvonen, A., Rellstab, C., Jokela, J., 2010. Is the population genetic structure of complex life cycle parasites determined by the geographic range of the most motile host? *Infect. Genet. Evol.* 10, 1271–1277. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.08.013>.
- Maa, T.C., 1969. A revised checklist and concise host index of Hippoboscidae (Diptera). *Pac. Insects Monogr.* 20, 261–299.
- Matthee, C.A., 2020. The influence of host dispersal on the gene flow and genetic diversity of generalist and specialist ectoparasites. *Afr. Zool.* 55, 119–126. <https://doi.org/10.1080/15627020.2020.1762512>.
- McCoy, K.D., Boulinier, T., Tirard, C., Michalakis, Y., 2003. Host-dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. *Evolution* 57, 288–296. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00263.x>.
- Minias, P., Włodarczyk, R., Meissner, W., Remisiewicz, M., Kaczmarek, K., Czapulak, A., Chylarecki, P., Wojciechowski, A., Janiszewski, T., 2010. The migration system of common snipe (*Gallinago gallinago*) on autumn passage through Central Europe. *Ardea* 98, 13–19. <https://doi.org/10.5253/078.098.0103>.
- Nadler, S.A., 1995. Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *J. Parasitol.* 81, 395–403.

- Nartshuk, E.P., Yatsuk, A.A., Matyukhin, A.V., Shokhrin, V.P., 2022. A new species of the genus *Ornithomya* (Diptera: Hippoboscidae) from the far East. *Zoosyst. Rossica* 31, 190–194. <https://doi.org/10.31610/zsr/2022.31.2.239>.
- Parasitism, Combes C., 1999. *The ecology and evolution of intimate interactions*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Parveen, S., Chakraborty, A., Chanda, D.K., Pramanik, S., Barik, A., Aditya, G., 2020. Microstructure analysis and chemical and mechanical characterization of the shells of three freshwater snails. *ACS Omega* 5 (40), 25757–25771. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03064>.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Pérez, S.D., Grummer, J.A., Fernandes-Santos, R.C., et al., 2019. Phylogenetics, patterns of genetic variation, and population dynamics of *Trypanosoma terrestris* support both coevolution and ecological host-fitting as processes driving trypanosome evolution. *Parasites Vectors* 12, 473. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3726-y>.
- Petersen, F.T., Meier, R., Kutty, S.N., Wiegmann, B.M., 2007. The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* 45, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.04.023>.
- Phares, K., 1995. An unusual host-parasite relationship: the growth hormone-like factor from plerocercoids of spirocercoid tapeworms. *Int. J. Parasitol.* 26, 575–588. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(96\)00025-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(96)00025-2).
- Poulin, R., 2007. *Evolutionary Ecology of Parasites*, second ed. Princeton University Press, Princeton. <https://doi.org/10.1515/9781400840809>.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
- Prugnolle, F., Théron, A., Pointier, J.P., Jabbour-Zahab, R., Jarne, P., Durand, P., de Meeûs, T., 2005. Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: consequence for local adaptation. *Evolution* 59, 296–303. <https://doi.org/10.1554/04-522>.
- Regoes, R.R., Nowak, M.A., Bonhoeffer, S., 2000. Evolution of virulence in a heterogeneous host population. *Evolution* 54, 64–71. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00008.x>.
- Santolíkova, A., Brzoňová, J., Čepička, I., Svobodová, M., 2022. Avian louse flies and their trypanosomes: new vectors, new lineages and host–parasite associations. *Microorganisms* 10, 584. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030584>.
- Shaw, C.L., Bilich, R., O'Brien, B., Cáceres, C.E., Hall, S.R., James, T.Y., Duffy, M.A., 2021. Genotypic variation in an ecologically important parasite is associated with host species, lake, and spore size. *Parasitology* 148, 1303–1312. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000949>.
- Spina, F., Baillie, S.R., Bairlein, F., Fiedler, W., Thorup, K. (Eds.), 2022. *The Eurasian African Bird Migration Atlas*. <https://migrationatlas.org>.
- Spottiswoode, C.N., Stevens, M., 2012. Host-parasite arms races and rapid changes in bird egg appearance. *Am. Nat.* 179, 633–648. <https://doi.org/10.1086/665031>.
- Tellier, A., Moreno-Gómez, S., Stephan, W., 2014. Speed of adaptation and genomic footprints of host-parasite coevolution under arms race and trench warfare dynamics. *Evolution*. <https://doi.org/10.1111/evo.12427>.
- TIBCO Statistica, V. 13.3.0, 2017. TIBCO Software Inc. <https://www.tibco.com/products/tibco-statistica>
- Van Dobben, W.H., 1952. The food of the cormorant in The Netherlands. *Ardea* 55, 1–63. <https://doi.org/10.5253/arde.v40.p1>.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Micro-Checker, Shipley P., 2004. Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>.
- Van Schaik, J., Dekeukeleire, D., Gazaryan, S., et al., 2018. Comparative phylogeography of a vulnerable bat and its ectoparasite reveals dispersal of a non-mobile parasite among distinct evolutionarily significant units of the host. *Conserv. Genet.* 19, 481–494. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1024-9>.
- Van Vliet, J., Musters, C.J.M., Ter Keurs, W.J., 2009. Changes in migration behaviour of blackbirds (*Turdus merula*) from The Netherlands. *Bird Study* 56, 276–281. <https://doi.org/10.1080/00063650902792148>.
- Veiga, J., De Oña, P., Salazar, B., Valera, F., 2019. Defining host range: host–parasite compatibility during the non-infective phase of the parasite also matters. *Parasitology* 146, 234–240. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001233>.
- Wawman, D.C., 2025. Citizen scientists mapping the United Kingdom's and Republic of Ireland's flat flies (louse flies) (Diptera: Hippoboscidae) reveal a vector's range shift. *Med. Vet. Entomol.* <https://doi.org/10.1111/mve.12795>.
- Wawman, D.C., Jones, B.P., Fiddaman, S.R., Turner, J.E., Johnson, N., Smith, A.L., 2025. A first report of the detection of Avipoxvirus genomic sequences in louse flies (Diptera: Hippoboscidae). *Parasitol* 1–26. <https://doi.org/10.1017/S0031182025000526>.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358–1370.

Rozdział III

Janiszewska, A., Minias, P., Włodarczyk, R., Kamiński, M., Jakubas, D., Remisiewicz, M., Szwed, J., Bartos, M. Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds. *Oikos* (w recenzji)

Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds

Journal:	<i>Oikos</i>
Manuscript ID	OIK-12066
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Keywords:	birds, comparative analysis, ectoparasites, host-parasite interactions, louse flies, <i>Ornithomya</i>
Abstract:	<p>The prevalence of ectoparasites is strongly affected by the host environment, which shapes not only host exposure, but also parasite transmission and survival. Louse flies (Diptera: Hippoboscidae) are obligate blood-feeding ectoparasites of birds and mammals, showing morphological adaptations to permanent life on the host body, such as dorsoventrally flattened bodies and strong claws. Here, we conducted a broad-scale screening of louse fly prevalence across 157 avian host species captured during autumn migration through Central Europe (over 100,000 individuals screened). We also ran a phylogenetically-informed comparative analysis to identify host traits shaping inter-specific variation in louse fly prevalence. We identified seven louse fly species across the entire sample, including two dominant species (<i>Ornithomya avicularia</i> and <i>O. fringillina</i>). The median louse fly prevalence across all host species was low (median prevalence 2.2% infected host individuals in 67% host species). Phylogenetically-informed Bayesian models revealed that the total louse fly prevalence was significantly associated with host species? body mass, precipitation within the host breeding range, host habitat type, trophic niche, and migration distance. However, models run separately for the two most prevalent louse fly species (<i>O. avicularia</i> and <i>O. fringillina</i>) showed contrasting (species-specific) effects of host traits. Our results revealed that inter-specific variation in the prevalence of the obligate avian ectoparasites is shaped by a complex combination of host life-history traits, habitat features, and climatic conditions. The study provides novel insights into the macroevolutionary trajectories of host-parasite interactions.</p>

Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds

Aleksandra Janiszewska^a, Piotr Minias^a, Radosław Włodarczyk^a, Maciej Kamiński^a, Dariusz Jakubas^b, Magdalena Remisiewicz^c, Hanna Sztwiertnia^d, Maciej Bartos^a

^aUniversity of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Biodiversity Studies and Bioeducation, Banacha 1/3, 90-237, Lodz, Poland

^bDepartment of Vertebrate Ecology and Zoology, Faculty of Biology, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, 80-309 Gdansk, Poland

^cBird Migration Research Station, Faculty of Biology, University of Gdańsk, Wita Stwosza 59, 80-309, Gdansk, Poland

^dSilesian Ornithological Society, Sienkiewicza 21, 50-335 Wroclaw, Poland

Abstract

The prevalence of ectoparasites is strongly affected by the host environment, which shapes not only host exposure, but also parasite transmission and survival. Louse flies (Diptera: Hippoboscidae) are obligate blood-feeding ectoparasites of birds and mammals, showing morphological adaptations to permanent life on the host body, such as dorsoventrally flattened bodies and strong claws. Here, we conducted a broad-scale screening of louse fly prevalence across 157 avian host species captured during autumn migration through Central Europe (over 100,000 individuals screened). We also ran a phylogenetically-informed comparative analysis to identify host traits shaping inter-specific variation in louse fly prevalence. We identified seven louse fly species across the entire sample, including two dominant species (*Ornithomya avicularia* and *O. fringillina*). The median louse fly prevalence across all host species was low (median prevalence 2.2% infected host individuals in 67% host species). Phylogenetically-informed Bayesian models revealed that the total louse fly prevalence was significantly associated with host species' body mass, precipitation within the host breeding range, host habitat type, trophic niche, and migration distance. However, models run separately for the two most prevalent louse fly species (*O. avicularia* and *O. fringillina*) showed contrasting (species-specific) effects of host traits. Our results revealed that inter-specific variation in the prevalence of the obligate avian ectoparasites is shaped by a complex combination of host life-history traits, habitat features, and climatic conditions. The study provides novel insights into the macroevolutionary trajectories of host-parasite interactions.

Keywords: birds, comparative analysis, ectoparasites, host-parasite interactions, louse flies, *Ornithomya*.

Introduction

Host-parasite relationships represent some of the most intricate forms of ecological interactions in the natural world. Parasites strive to optimise their transmission and survival, while hosts evolve defences to avoid exploitation (Dawkins & Krebs 1979). This ongoing coevolutionary arms race is widely recognised as the major driver of biological diversity (Hall et al. 2011). In the early evolutionary stages of parasitism, parasites often exhibit low host specificity and limited anatomical or physiological adaptations to particular hosts (Boeger et al. 2003). However, over evolutionary time, close host-parasite associations tend to promote the development of highly specialised parasitic strategies and traits that enhance exploitation of fewer and less diverse hosts (Brockhurst et al. 2014). This process of parasitic specialisation, shaped by host ecology, behaviour, and immune responses, is thought to be favoured over generalist strategies, primarily due to the higher physiological and ecological costs of the latter (Fain 1994, Combes 1999, Vázquez et al. 2005). Parasite prevalence is among the key parameters for understanding the ecological dimension of host-parasite interactions. It is governed by a range of host-related behavioural, environmental, and demographic factors, and can serve as an indicator of host population health or environmental disturbance (Mborá & McPeck 2008, Turcotte et al. 2018, Kołodziej-Sobocińska 2019). Comparative analyses of parasite prevalence among host species are traditionally used to investigate variation in host susceptibility, as well as identify species that may serve as key reservoirs or transmission hubs.

Ectoparasites have evolved a variety of adaptations to take advantage of their hosts and survive in a specific external environment, such as the body surface of their hosts (Marshall 1981, Poulin 2007). In contrast to internal parasites, ectoparasites are continuously exposed not only to environmental factors, but also to host defensive activities, such as grooming, preening, sand bathing or skin secretions. Hence, many ectoparasites have developed morphological, physiological, and behavioural counter-adaptations that closely match host biology (Clayton et al. 2013, Price et al. 2003). These include development of specialised claws for adhering to host integument, flattened bodies for travelling through feathers or fur, and cryptic colouration or microhabitat preferences that make them more difficult to locate and identify by the host (Bush et al. 2010, Johnson et al. 2012, Abad-Franch et al. 2021).

Ectoparasite prevalence is also significantly influenced by the host environment. For instance, the level of ectoparasite activity is often determined by ambient temperature (Franke et al. 2017, Holand et al. 2019) and humidity (Moyer et al. 2002, Dube et al. 2018). The effects of environmental factors on ectoparasite activity and prevalence may also be modulated by

climate changes (Heath 2020, Ajith et al. 2020), as well as anthropogenic degradation of host habitats (Shilereyo et al. 2022; Babyesiza et al. 2023, Gebrezgiher et al. 2023).

Louse flies (Diptera: Hippoboscidae) are hematophagous ectoparasites of warm-blooded animals. So far, 213 louse fly species have been described worldwide, most of which parasitize birds. Many louse fly species exhibit varying degrees of host specificity. For example, *Ornithomya avicularia* is one of the most common louse flies parasitizing a variety of bird species (both passerines and non-passerines) across the Palearctic region (Oboňa et al. 2019), whereas *Ornithomya fringillina* mainly targets passerine birds, although it is also less frequently found on species from other avian orders. It has been recognized that biological characteristics of birds, such as habitat type, migration strategy, nesting method, or lifestyle (e.g., colonial vs. solitary), can affect infestation risk and the intensity of host colonization by louse flies (Santolíkova et al. 2022, Keve et al. 2024). However, rigorous comparative analyses of louse fly prevalence across a broad spectrum of phylogenetically diverse host species are virtually lacking. Among the exceptions, a comparative analysis of louse fly prevalence estimates from nearly 10,000 bird individuals of 134 species (Finland) provided clear evidence for the effects of host breeding habitat and nesting strategy on infestation by these ectoparasites (Lehikoinen et al. 2021). The data used in these analyses originated, in significant part, from breeding birds, which could promote associations of louse fly prevalence with host breeding biology. It may though be expected that different sets of host traits could better predict inter-specific variation in louse fly prevalence during non-breeding stages of host annual cycle, such as seasonal migration.

The aim of our study was to investigate variation in louse prevalence among avian host species during autumn migration. For this purpose, we quantified louse fly prevalence across over 100,000 individuals of 157 species migrating through Central Europe (Poland). First, we tested for the associations of the total louse fly prevalence with a broad spectrum of host traits related to ecology, biogeography, behaviour, phenology, and population age structure. Second, we collected over 1,000 louse fly specimens for species identification and investigated the patterns of inter-specific variation in the prevalence of *O. avicularia* and *O. fringillina* – two most common louse fly species parasitizing birds in Europe. We expected that the prevalence of both louse fly species may be shaped by different sets of host traits, due to their different parasitic strategies (generalist and specialist, respectively) and host preferences.

Material and Methods

Study sites and data collection

The data on louse fly prevalence were collected between 2014 and 2023 during the autumn bird migration period (late July to mid-November). Fieldwork was conducted at four sites scattered across Poland: at the southern Baltic coast (stations: Mierzeja Wiślana at the Vistula Spit and Bukowo, at the spit between Lake Bukowo and the Baltic Sea), in the Żuławy Alluvial Plain in northern Poland (Druzno Lake), central lowlands (Jezioro Reservoir), and uplands of the central Sudetes Mountains in southern Poland (Bukówka Reservoir). Birds were captured as part of long-term bird ringing programs using mist nets and funnel traps. Each captured bird was weighed, measured, and aged according to standard bird ringing protocols. Afterwards, wing and body feathers were carefully inspected for the presence of louse flies. Louse flies noticed on the earlier stages of bird handling (in the mist nets or during transport/ringing) were also recorded. Bird age was categorized into two classes: juvenile or adult, with juveniles representing the large majority of all inspected individuals (87.2%). For each species, the median capture date was calculated as a phenological index of peak migration (ranging from 30th of July to 2nd of November).

In total, $n = 104,117$ individuals from 157 bird species were inspected for the occurrence of louse flies, representing 15 avian orders, 41 families and 79 genera. The data were poorly balanced in terms of host taxonomic composition and sample sizes, as most species ($n = 93$) originated from a single order of Passeriformes and sample sizes ranged from a single screened individual to several thousand individuals (max. 17,302 individuals for European robin *Erithacus rubecula*) per species (median = 33 individuals). The prevalence of louse flies was calculated as the proportion of the number of infected individuals to the total number of inspected individuals per each host species. The prevalence was calculated and reported for 79 host species ($n = 102,748$ individuals) with a sample size of at least 10 inspected individuals (representing 10 avian orders and 31 families). The remaining 52 species had a sample size of < 10 inspected individuals.

A proportion (67.4%) of all detected louse flies was collected and preserved in 96% ethanol. All collected specimens were subsequently identified under a stereomicroscope following the taxonomic keys developed by Borowiec (1984) and Hutson (1984). The morphological identification of randomly selected specimens from each species was confirmed molecularly by barcoding approach (protocols described in Rewicz et al. 2021).

Host traits

In order to identify macroecological drivers shaping inter-specific variation in the louse fly prevalence across bird species, we quantified various biogeographical, climatic, ecological, and life-history traits of avian hosts. First, to quantify mean breeding latitude and migration distance (km), we used breeding and non-breeding distributional range maps obtained from BirdLife International and Handbook of the Birds of the World (2016). Following the methodology described in Minias & Włodarczyk (2020), we calculated the geographic centroid of breeding and wintering range using the *gCentroid* function from the *rgeos* package (Bivand & Rundel, 2023) developed for R statistical environment (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Breeding latitude was expressed as the latitude of the centroid of the breeding range (breeding/resident spatial polygons). Migration distance was calculated as the distance between the centroids of breeding and non-breeding (non-breeding/resident spatial polygons) ranges.

To quantify climatic conditions within the breeding ranges of host species, we extracted spatial data on annual mean temperature (°C) and annual mean precipitation (mm). Information on both climatic variables were obtained from the WorldClim database v2.0 (Fick & Hijmans 2017) at a spatial resolution of 10 arc-minutes. Using breeding and resident range polygons (BirdLife International), we calculated the average value of each climatic variable across the entire breeding range of each species. Calculations were performed in R software using the *lets.summarizer* function from the *letsR* package (Vilela & Villalobos 2015).

Next, we used published datasets to compile information on three ecological and reproductive host traits, including trophic niche (AVONET database; Tobias et al. 2021), as well as habitat type and nest placement (Tobias & Pigot 2019). Trophic niche was grouped into 5 categories: aquatic predator (30 species), herbivore (20 species), invertivore (74 species), omnivore (21 species), and vertivore (12 species). Habitat type was grouped into four major categories: woodland (including forest; 69 species), wetland (including riverine; 44 species), grassland (16 species), and shrubland (14 species). The remaining habitats with low representation (<10 species) in the dataset (i.e. coastal, rock, and human-modified habitats) were grouped into a single category (henceforth referred to as other habitats; 14 species). Nest placement was classified in a simple three-way system as cavity (52 species), exposed elevated (57 species), and exposed ground nest (48 species).

Finally, information on body mass (g) and clutch size (number of eggs) were compiled from monographies of birds of the world (del Hoyo et al. 1992, 2011; Snow & Perrins, 1998),

with additional body mass data extracted from Dunning (2008). Due to right-skewed distributions, both body mass and clutch size were log-transformed prior to statistical analyses.

Comparative analyses

To investigate variation in louse fly prevalence across avian species, we employed Bayesian phylogenetically-informed mixed models (Hadfield & Nakagawa 2010) implemented in the *MCMCglmm* R package (Hadfield 2010). First, the number of host individuals (birds) infected with louse flies (regardless of species) was used as the response variable and modelled as count data using a Poisson distribution. Second, we ran similar models using the number of birds infected with either of the two most prevalent louse fly species (*O. avicularia* and *O. fringillina*) as the response variables. Predictors (fixed effects and covariates) included biogeographic (host species breeding latitude and migration distance), climatic (annual mean temperature and annual mean precipitation within host breeding range), ecological (habitat type, trophic niche, and nest placement), and life history (body mass and clutch size) traits. We also included host age structure (proportion of adults) and median capture date as additional predictors. The total sample size (number of host individuals screened for louse fly presence) was included as an offset in each model. To account for phylogenetic non-independence among host species, we included a random effect of species identity linked to phylogeny. Phylogenetic relationships were reconstructed based on the comprehensive time-calibrated avian tree available at the BirdTree webserver (Jetz et al. 2021). To address phylogenetic uncertainty, we first retrieved 1,000 alternative trees for our study host species using a backbone topology described by Ericson et al. (2006) and then used Geneious v.10.0.5 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) to summarize all alternative trees into a single consensus tree that was used in the analyses (Figure 1).

Uninformative priors were specified for the variance components (variance set to one and belief parameter set to 0.002 in R and G structures), but a strong prior was used to hold the coefficient associated with offset at one (B structure). Markov chain Monte Carlo simulations were run for 500,000 iterations, with a burn-in of 100,000 and a thinning interval of 400, yielding 1,000 expected posterior samples per chain. Consistent with this expectation, an average effective sample size for model parameters was 948.7 ± 129.3 [SE]. Chain convergence was assessed using two alternative approaches: *i*) inspection of trace plots (Roy 2020) and *ii*) application of Geweke diagnostic, i.e. z-score tests investigating the difference in the means of

the first (10%) and the last part (50%) of each chain ($z < 1.96$ was used to infer sufficient convergence) (Geweke 1992).

Originally, all the models were run on the full dataset ($n = 157$ bird species). However, to check if our results were not biased by the presence of host species with small sample sizes (possibly yielding inaccurate estimates of louse fly prevalence), we subsampled the data based on the sample size threshold ($n = 105$ bird species with at least 10 screened individuals) and re-ran all the models. To obtain more parsimonious reduced models, highly non-significant predictors ($p > 0.25$) were removed from the full models. Model reduction was conducted in a single step to avoid biases (inflation of type I error rates) caused by multiple testing under the traditional stepwise approach (Mundry & Nunn 2008). All values are reported as means \pm SE.

Results

Louse fly prevalence and host-specificity

Approximately half of all studied bird species (79 out of 157) were found to be infected with louse flies. However, after excluding species with low sample sizes (< 10 individuals screened), the proportion of infected bird species increased to ca. 70% (73 out of 105; Fig. 1). Among infected species, the total louse fly prevalence ranged from 0.07% to 26.7%, while median prevalence was 2.2% (Fig. 1). Exceptionally high prevalences of louse flies were recorded in some non-passerine bird species, especially owls Strigidae: tawny owl *Strix aluco* - 26.7% and long-eared owl *Asio otus* - 18.2%, but also in passerine species e.g. the bearded reedling *Panurus biarmicus* - 22.1% (Fig. 1).

Seven species of louse flies from three genera were identified across all host species: *O. fringillina*, *O. avicularia*, *O. biloba*, *O. chloropus*, *Icosta ardeae*, *Lipoptena fortisetosa*, and *L. cervi*. Two species (*O. fringillina* and *O. avicularia*) were found to be clearly dominant in our dataset (49.0% and 36.8% of all collected louse flies, respectively). *O. fringillina* showed a relatively high degree of host specificity and was mostly associated with small passerines (recorded in 40 passerine species), with only two specimens recorded in non-passerines (woodpeckers Picidae) (Fig. 1). It was particularly prevalent in wetland-associated passerines, such as the bearded reedling (11.4%), Savi's warbler *Locustella luscinioides* (4.2%) and bluethroat *Luscinia svecica* (3.8%). In contrast, *O. avicularia* was more generalist, being recorded in 40 phylogenetically diverse host species representing eight avian orders (Fig. 1). It was most prevalent in divergent non-passerine hosts, such as the tawny owl (20%), long-eared

owl (18.6%), black woodpecker *Dryocopus martius* (7.7%), and spotted crane *Porzana porzana* (7.1%). The remaining two *Ornithomya* species (*O. biloba* and *O. chloropus*) were much less common (8.7% and 3.9% of all collected louse flies, respectively). *O. biloba* was highly host specific and almost exclusively recorded in barn swallows *Hirundo rustica*, except for single specimens collected from two passerine species (Savi's warbler and marsh warbler *Acrocephalus palustris*). In contrast, *O. chloropus* was more generalist and recorded in nine host species, representing both passerines (three species, most prevalent in the common reed warbler *Acrocephalus scirpaceus*) and non-passerines (six species, most prevalent in the common snipe *Gallinago gallinago*). Cervid-associated *Lipoptena* species were recorded only occasionally (1.6 % of all collected louse flies).

Associations of total louse flies prevalence with host traits

Phylogenetically-informed analysis across the entire dataset (n = 157 bird species) identified five host traits as significant predictors of total louse fly prevalence (all louse fly species combined). First, for the reduced model, we found a significant association between host body mass and louse fly prevalence, as larger bird species were more likely to be infected ($\beta = 0.908$; 95% CI: 0.212 to 1.678; $p = 0.014$; Table 1). Total louse fly prevalence was also significantly associated with migration distance ($\beta = -0.0001$; 95% CI: -0.0002 to 0.0000; $p = 0.020$; Table 1; Fig. 2A), indicating that the louse flies prevalence decreased with the migration distance of their bird host species. Louse fly prevalence decreased significantly with an increase in the annual mean precipitation within the host breeding range ($\beta = -0.004$; 95% CI: -0.007 to -0.002; $p = 0.002$; Table 1; Fig 2B). Habitat type emerged as another significant predictor, since bird host species associated with woodland and grassland habitats showed lower prevalence compared to wetland birds (woodland: $\beta = -1.181$; 95% CI: -1.900 to -0.521; $p = 0.002$; grassland; $\beta = -1.258$; 95% CI: -2.481 to -0.166; $p = 0.030$; Table 1; Fig. 2C). Finally, louse fly prevalence was significantly lower in omnivore than vertivore bird species ($\beta = -1.507$; 95% CI: -2.839 to -0.200; $p = 0.040$; Table 1; Fig. 2D), indicating that probability of infestation was related to host foraging strategy or diet.

The remaining host-related traits (age, date, clutch size, breeding latitude, annual mean temperature, and nest placement) in full model showed no significant association with louse fly prevalence (all $p > 0.10$; Table 1). Most of the significant associations were retained in the model based on the subsampled data (species with small sample sizes excluded). Specifically, mean annual precipitation, habitat and trophic niche were still identified as significant

predictors of total louse fly prevalence, while the body mass and migration distance remained marginally significant (Table S1 in the Electronic Supplementary Material).

Host traits as predictors *O. avicularia* and *O. fringillina* prevalence

Separate models for the two most common louse fly species revealed contrasting associations of host traits with the prevalence of *O. avicularia* and *O. fringillina*. Host body mass was positively associated with the prevalence of *O. avicularia* ($\beta = 2.499$; 95% CI: 1.495 to 3.527; $p < 0.001$; Table 2; Figure 3A), but negatively associated with the prevalence of *O. fringillina* ($\beta = -1.914$; 95% CI: -3.189 to -0.630; $p < 0.010$; Table 3; Figure 3B). Annual mean precipitation was negatively associated with *O. avicularia* prevalence ($\beta = -0.006$; 95% CI: -0.010 to -0.001; $p = 0.004$), but not with *O. fringillina* prevalence (Tables 2 and 3). In contrast, migration distance was identified as a significant predictor of *O. fringillina* prevalence (lower prevalence with increasing migration distance; $\beta = -0.0002$; 95% CI: -0.0003 to -0.00005; $p = 0.010$; Table 3), but showed no significant association with *O. avicularia* prevalence (Table 2). Host habitat was identified as the only predictor showing similar effect across the two louse fly species, as both *O. avicularia* and *O. fringillina* were less prevalent in hosts from woodland than wetland habitats (*O. avicularia*: $\beta = -1.088$; 95% CI: -2.136 to -0.002; $p = 0.050$; *O. fringillina*: $\beta = -2.288$; 95% CI: -3.200 to -1.376; $p < 0.001$; Tables 2 and 3). However, the prevalence of *O. fringillina* was also significantly lower in hosts from other (coastal, rock, and human-modified) habitats than wetlands ($\beta = -2.597$; 95% CI: -4.937 to -0.443; $p = 0.010$; Table 3).

Other predictors (age, date, clutch size, breeding latitude, annual mean temperature, trophic niche, and nest placement) did not show significant associations with the prevalence of either species ($p > 0.05$; Tables 2 and 3). Analyses limited to species with at least ten host individuals (reduced model) screened yielded largely consistent results, supporting the significance and directionality of associations detected for both *O. avicularia* (body mass and annual precipitation; Table S2 in the Electronic Supplementary Material) and *O. fringillina* (body mass, migration distance, and habitat type; Table S3). At the same time, the models on subsampled data showed significant effects of nest placement on *O. avicularia* prevalence (higher prevalence in open elevated than cavity nests; $\beta = 1.187$; 95% CI: 0.0000 to 2.350; $p = 0.046$; Table S2 in the Electronic Supplementary Material) and annual mean precipitation on *O. fringillina* prevalence (lower prevalence in host exposed to more precipitation; $\beta = -0.006$; 95% CI: -0.012 to 0.000; $p = 0.044$; Table S3 in the Electronic Supplementary Material).

Discussion

Our broad-scale comparative analysis provided novel insights into how life history traits and ecological niches of host species shape ectoparasite (louse fly) occurrence across divergent bird taxa. Approximately 70% of bird species were infested with louse flies, with the highest prevalence observed in owls. Two louse fly species, *O. fringillina* (showing high specificity to small passerines) and *O. avicularia* (more generalist), were dominant across the dataset. Phylogenetically informed analyses revealed that the overall louse fly prevalence was significantly associated with several host-related traits: it decreased with migration distance and annual precipitation within host breeding range, but increased with larger host body size and in certain habitat types. Moreover, omnivorous bird species showed significantly lower infestation probabilities than vertivores, reinforcing the role of host foraging strategy or diet in louse fly transmission. Separate models for the two dominant louse flies highlighted contrasting host associations, suggesting divergent ecological strategies between *O. fringillina* and *O. avicularia*. These findings contribute to a more comprehensive picture of parasite dynamics in migratory bird populations and highlight the complex interplay between host biology and parasite ecology.

It has long been recognized that host species body size is a major determinant of parasite prevalence, since larger hosts offer a greater space (surface), higher resource availability and wider microhabitat (niche) diversity for ectoparasites (Poulin 1995, Clayton & Walther 1997). This may not only increase the richness of parasitic communities but also facilitate parasite reproduction and survival, hence increasing their abundance and transmission. Among avian hosts, species with larger body mass are often more heavily infested with ectoparasites, likely because their size increases detectability by parasites and reduces the efficiency of host grooming (Chu et al. 2019). Similar patterns have been reported in other host-parasite systems (Shuai et al. 2022, Henriksen et al. 2023), including the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*, where larger individuals carried higher loads of fleas and ticks (Zduniak et al. 2023). Our analyses revealed that host species-level mean body mass was an important positive predictor of total louse fly prevalence. At the same time, we found that different louse fly species showed contrasting associations with host species body mass. A strong positive relationship was detected in *O. avicularia*, a generalist species that appears to effectively exploit larger hosts. The stronger association of *O. avicularia* with larger-bodied hosts may reflect constraints related to parasite body size and life history. As a relatively large avian louse fly, *O. avicularia* may not be able to exploit small passerines efficiently, either because limited space

and resources on the host reduce its survival or because it is more easily detected and removed by host grooming. In contrast, *O. fringillina*, exhibited a negative association with host body mass, being consistent with specialization toward infecting small passerines. Consequently, this species appears less constrained by host morphology and size, which could be explained by its smaller structural dimensions or greater ecological flexibility. In fact, within our dataset, the largest hosts (e.g. long-eared owl, western marsh harrier *Circus aeruginosus*, or Eurasian sparrowhawk *Accipiter nisus*) were often parasitized exclusively by *O. avicularia*, while the smallest hosts (e.g. goldcrest *Regulus regulus* and firecrest *Regulus ignicapilla*) were only infected by *O. fringillina*. These differences highlight that even among generalist species, host-parasite associations can be shaped by species-specific morphological and ecological traits.

Climatic conditions, particularly humidity and precipitation, are well known to influence the ecology of ectoparasitic insects, as moderate humidity often enhances parasite survival by reducing desiccation risk (Marshall 1981). While adult louse flies are expected to experience relatively constant microclimatic conditions in the plumage on their homeothermic avian hosts, overwintering puparia and free-flying adults in search of the host may be vulnerable to adverse abiotic conditions, including temperature, humidity, and precipitation encountered outside the hosts (Harkonen et al. 2012, Kaunisto et al. 2015). Our analyses indicated that annual precipitation was negatively associated with louse fly prevalence. Rain, often associated with lower temperatures, is known to markedly reduce the mobility of insects, particularly by hindering their ability to fly. For poor fliers, such as louse flies, it can significantly impair host-finding, thereby increasing mortality. It is also likely that soaked feathers provide a much poorer refuge for louse flies, making them more easily detected by birds. Moreover, the drying and preening of wet feathers by birds may further increase the likelihood of louse flies being detected and removed by the host.

Habitat type was another important determinant of louse fly prevalence. Our results indicate that habitat type significantly influenced infestation rates, with woodland and grassland species showing lower prevalence compared to hosts associated with wetlands. This pattern was consistent across *O. avicularia* and *O. fringillina*, suggesting that the effect is not species-specific, but instead reflects a general trend of reduced louse fly prevalence in non-wetland environments. A similar relationship was also observed for the total prevalence across all louse fly species. The lower occurrence of louse flies in woodlands may be linked to reduced host encounter rates or less favourable microclimatic conditions for parasite persistence compared to wetland habitats (Chahad-Ehlers et al. 2018, van Hoesel et al. 2020). Interestingly, Lehtikoinen et al. (2021) reported the opposite pattern, where *O. fringillina* preferred hosts

associated with forest habitats, whereas all three (*O. avicularia*, *O. chloropus*, *O. fringillina*) louse fly species tended to avoid wetland-associated hosts. This remarkable discrepancy suggests that associations of louse flies with hosts from varying habitats may be strongly dependent on the ecological or environmental context. Specifically, these contrasting patterns could either reflect variation across different stages of the host annual cycle, i.e. reproductive season (the study by Lehtonen et al. 2021 included data from breeding birds) vs. migration (our study), or geographic variation, with distinct patterns in Fennoscandia compared to Central Europe.

Trophic niche was also associated with louse fly prevalence, as host species classified as carnivores exhibited significantly higher infestation rates compared to omnivores. In general, predators feeding on a wide range of smaller prey tend to accumulate more parasites, due to increased opportunities for cross-species transmission (Orlofske et al. 2015, McDevitt-Galles et al. 2021). Hence, it is possible that avian raptors may acquire a variety of louse flies directly from their prey. Also, predators are generally larger than species occupying other trophic niches, and thus they can offer ectoparasites a broader range of habitats and resources, thus increasing their total prevalence. This highlights the importance of host trophic niche heterogeneity for parasite transmission, suggesting that both foraging mode and prey diversity may shape host-parasite associations in natural populations. By contrast, when examining individual louse fly species, trophic niche did not emerge as a significant predictor of prevalence. Both *O. avicularia* and *O. fringillina* showed stronger associations with host body size and habitat type rather than host diet, suggesting that structural and ecological traits of hosts are more relevant determinants of infestation risk by particular louse fly species than host foraging strategy.

Migration distance emerged as a significant predictor of louse fly prevalence. The prevalence decreased with increasing migration distance, consistent with the idea that long-distance movements may disrupt parasite transmission cycles and reduce infestation through mechanical loss or mortality of ectoparasites during prolonged flights (Jenkins et al. 2012). This pattern was particularly clear for *O. fringillina*, which showed significantly lower prevalence with increasing migration distance. This species is closely associated with small passerines, including those one migrating to sub-Saharan Africa, such as the wetland species Savi's Warbler, Eurasian Reed Warbler and Great Reed Warbler. Their long migration distance may impose a strong constraint on ectoparasite persistence. However, in our study, *O. fringillina* were most common in short-distance wetland migrants, as the bearded reedling, and in owls, which migrate only within Europe. It can explain the negative relationship between this parasite prevalence and the host migration distance. By contrast, the prevalence of *O. avicularia* showed

only a marginally significant relationship with the migration distance, which may reflect its ability to exploit both resident and short-distance migrant hosts across a wide ecological range. It is also possible that short-distance migrants not only retain parasites more effectively, but also contribute to their local transmission by scattering puparia produced continuously by females until autumn (Janiszewska et al. 2025). Resident birds tend to use the same areas and habitats for breeding and foraging outside the breeding season, which may increase their exposure to louse fly puparia and boost local transmission cycles. Lehtikoinen et al. (2021) did not detect any associations between louse flies and migration distance, suggesting that such relationships may become more evident during the migration period itself (as observed in our study).

Host nest type did not predict overall louse fly prevalence in our dataset, but we detected species-specific responses of louse flies to host nest placement. Specifically, *O. avicularia* tended to be more prevalent in hosts that use open elevated nests for breeding, suggesting that exposed nesting environments may facilitate parasite transmission by increasing accessibility to different hosts and contact rates among individuals. This result is consistent with earlier studies showing that nest architecture influences ectoparasite colonization and host-parasite interactions (Møller 1991). In contrast, *O. fringillina* did not exhibit any association with nest type, indicating that its prevalence is more strongly determined by host size and habitat than by its breeding ecology. Consistent with our results, Lehtikoinen et al. (2021) reported a preference of *O. avicularia* for hosts breeding in open tree nests. However, these analyses did not rely on the prevalence data, but were limited to the comparison of the proportions of host (and non-host) species using different nest types. Our comparative analysis adds to the previous research, showing that open nesting birds are not only preferred as hosts by *O. avicularia*, but open nesting also increases *O. avicularia* prevalence, likely due to enhanced transmission.

Despite robust data (over 100,000 individuals screened), some limitations of our study should be acknowledged. By focusing only on the autumn migration period, our study may not capture peak parasite prevalence occurring in other seasons. For instance, research on avian haemosporidian parasites have consistently shown higher infestation intensities in summer and spring, both during breeding and stopover periods (Šujanová et al. 2021, Han et al. 2023). Similarly, seasonal profiles of generalist ecto- and endo-parasites indicate marked fluctuations across the annual cycle, with microhabitat changes during reproductive season playing a key role (e.g. *I. ricinus* and *I. arboricola* infestation rates dropping from ca 21.6 % during breeding to 6.8 % in the non-breeding period) (Kocianová et al. 2017). As a result, our estimates of louse fly prevalence may not be easily extrapolatable to pre-breeding or breeding seasons, when host

nesting behaviour enhances transmission opportunities. On the other hand, louse flies that attach to a host during the nesting period usually remain with it until the end of their lives, and at least infestation by most females (which live longer than males; Kemper 1951) should well extend into the autumn period, when we conducted sampling. Nevertheless, incorporating sampling over different seasons would provide a more comprehensive picture of host-parasite dynamics.

In conclusion, our findings provide novel evidence on the ecological and environmental factors shaping louse fly distribution in birds using European migratory flyways. Our results indicate that louse fly prevalence during autumn migration is influenced not only by morphological and ecological host traits, such as body size, habitat or trophic niche, but also by annual climatic conditions within the host breeding range. These results contribute to the growing understanding of host-parasite interactions in highly dynamic biological systems shaped by the extreme mobility of host organisms. We recommend that future studies aim to collect and incorporate data from across the entire host annual cycle and across multiple geographic regions, as well as examine potential fitness costs of infestation by louse flies. Combining ecological, behavioural, and physiological data is likely to further advance our understanding of the role of ectoparasites, such as louse flies, in shaping migratory strategies and host life histories.

CRedit authorship contribution statement

Aleksandra Janiszewska: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Visualization, Writing – original draft. Piotr Minias: Conceptualization, Data curation Investigation, Resources, Writing – review & editing. Radosław Włodarczyk: Writing – review & editing, Resources, Investigation. Maciej Kaminski: Writing – review & editing, Resources, Investigation. Dariusz Jakubas: Writing – review & editing, Resources, Investigation. Magdalena Remisiewicz: Writing – review & editing, Resources, Investigation. Hanna Sztwiertnia: Writing – review & editing, Resources, Investigation. Maciej Bartos: Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Investigation, Data curation, Conceptualization.

References

- Abad-Franch F, Monteiro F.A., Pavan M.G., et al. (2021) Under pressure: phenotypic divergence and convergence associated with microhabitat adaptations in Triatominae. *Parasites & Vectors* 14, 195. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04647-z>
- Ajith Y., Dimri U., Madhesh E., Kumar D., Gopalakrishnan A., Sharma M.C. (2020) Influence of weather patterns and air quality on ecological population dynamics of ectoparasites in goats. *International Journal of Biometeorology* 64(10), 1731–1742. <https://doi.org/10.1007/s00484-020-01952-7>
- Babyesiza W.S., Mpagi J., Ssuuna J., Akoth S., Katakweba A. (2023) Ectoparasite fauna of rodents and shrews with their spatial, temporal and dispersal along a degradation gradient in Mabira Central Forest Reserve. *Journal of Parasitology Research* 2023, 7074041. <https://doi.org/10.1155/2023/7074041>
- BirdLife International & Handbook of the Birds of the World (2016) Bird species distribution maps of the world, ver. 6.0. Retrieved from <http://datazone.birdlife.org/species/requestdis>
- Bivand, R. & Rundel, C. 2023. rgeos: Interface to Geometry Engine, Open Source ('GEOS'). <https://r-forge.r-project.org/projects/rgeos/>
- Boeger W.A., Kritsky D.C., Pie M.R. (2003) Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogeneoidea). *Zoologica Scripta* 32(2), 159–172. <https://doi.org/10.1046/j.1463-6409.2003.00130.x>
- Brockhurst M.A., Chapman T.A., King K.C., Mank J.E., Paterson S., Hurst G.D.D. (2014) Running with the Red Queen: the role of biotic conflicts in evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281(1797), 201413823. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1382>
- Bush S.E., Kim D., Reed M., Clayton D.H. (2010) Evolution of cryptic coloration in ectoparasites. *The American Naturalist* 176(4), 529–535. <https://doi.org/10.1086/656269>
- Chahad-Ehlers S., Fushita A.T., Lacorte G.A., et al. (2018) Effects of habitat suitability for vectors, environmental factors and host characteristics on the spatial distribution of the diversity and prevalence of haemosporidians in waterbirds from three Brazilian wetlands. *Parasites & Vectors* 11, 276. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2847-z>

- Chu X., Xia C., Yang C., Jiang W., Liang W., Stokke B.G. (2019) The influence of host body size and food guild on chewing louse prevalence in birds. *Journal of Parasitology* 105(2), 301–305. <https://doi.org/10.1645/17-137>
- Clayton D.H., Walther B.A. (1997) Collection and quantification of arthropod parasites of birds. In: Clayton D.H., Moore J. (eds), *Host–parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press, pp. 419–440.
- Clayton D.H., Moore J. (eds) (2013) *Host–parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford.
- Dawkins R., Krebs J.R. (1979) Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 205(1161), 489–511. <https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0081>
- del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J. (1992–2011) *Handbook of the birds of the world* (vol. 1–16). Lynx Edicions, Barcelona.
- Dube W.C., Hund A.K., Turbek S.P., Safran R.J. (2018) Microclimate and host body condition influence mite population growth in a wild bird–ectoparasite system. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 7(3), 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.07.007>
- Dunning J.B. Jr (2008) *CRC handbook of avian body masses*. CRC Press, Boca Raton.
- Ericson P.G., Anderson C.L., Britton T., Elzanowski A., Johansson U.S., Källersjö M., Ohlson J.I., Parsons T.J., Zuccon D., Mayr G. (2006) Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters* 2, 543–547. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0523>
- Fain A. (1994) Adaptation, specificity and host–parasite coevolution in mites (Acari). *International Journal for Parasitology* 24(8), 1273–1283. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90194-5](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90194-5)
- Fick S.E., Hijmans R.J. (2017) WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 37, 4302–4315. <https://doi.org/10.1002/joc.5086>

- Franke F., Armitage S.A.O., Kutzer M.A.M., et al. (2017) Environmental temperature variation influences fitness trade-offs and tolerance in a fish–tapeworm association. *Parasites & Vectors* 10, 252. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2192-7>
- Gebrezgiher G.B., Makundi R.H., Katakweba A.A.S., Belmain S.R., Lyimo C.M., Meheretu Y. (2023) Arthropod ectoparasites of two rodent species occurring in varied elevations on Tanzania’s second highest mountain. *Biology* 12(3), 394. <https://doi.org/10.3390/biology12030394>
- Geweke J. (1992) Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to the calculation of posterior moments. In: Bernardo J.M., Berger A.P., Dawid A.P., Smith A.F.M. (eds), *Bayesian statistics 4*. Oxford University Press, pp. 169–193.
- Hadfield J.D. (2010) MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: the MCMCglmm R package. *Journal of Statistical Software* 33, 1–22.
- Hadfield J.D., Nakagawa S. (2010) General quantitative genetic methods for comparative biology: phylogenies, taxonomies and multi-trait models for continuous and categorical characters. *Journal of Evolutionary Biology* 23, 494–508. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01915.x>
- Hall A.R., Scanlan P.D., Morgan A.D., Buckling A. (2011) Host–parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection. *Ecology Letters* 14(7), 635–642. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01624.x>
- Han Y., Hellgren O., Wu Q., Liu J., Jin T., Bensch S., Ding P. (2023) Seasonal variations of intensity of avian malaria infection in the Thousand Island Lake System, China. *Parasites & Vectors* 16(1), 218. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05848-4>
- Harkonen L., Kaitala A., Kaunisto S., Repo T. (2012) High cold tolerance through four seasons and all free-living stages in an ectoparasite. *Parasitology* 139(7), 926–933. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000091>
- Heath A.C. (2020) Climate change and its potential for altering the phenology and ecology of some common and widespread arthropod parasites in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 69(1), 5–19. <https://doi.org/10.1080/00480169.2020.1787276>
- Henriksen E.H., Frainer A., Poulin R., Knudsen R., Amundsen P.A. (2023) Ectoparasite population dynamics are affected by host body size but not host density or water temperature in a 32-year long time series. *Oikos* 2023, e09328. <https://doi.org/10.1111/oik.09328>

- Holand H., Jensen H., Kvalnes T., Tufto J., Pärn H., Sæther B.E., Ringsby T.H. (2019) Parasite prevalence increases with temperature in an avian metapopulation in northern Norway. *Parasitology* 146(8), 1030–1035. <https://doi.org/10.1017/S0031182019000337>
- Hutson A.M. (1984) *Diptera: Keds, flat-flies & bat-flies (Hippoboscidae & Nycteribiidae)* (Vol. 10, Pt. 7). Royal Entomological Society of London (Handbooks for the Identification of British Insects).
- Janiszewska A., Rewicz T., Minias P., Włodarczyk R., Kamiński M., Fiutek P., Jakubas D., Rapczyński J., Remisiewicz M., Sztwiertnia H., Bartos M. (2025) Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 27, 101081. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2025.101081>
- Jenkins T., Thomas G.H., Hellgren O., Owens I.P.F. (2012) Migratory behavior of birds affects their coevolutionary relationship with blood parasites. *Evolution* 66(3), 740–751. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01470.x>
- Jetz W., Thomas G.H., Joy J.B., Hartmann K., Mooers A.O. (2012) The global diversity of birds in space and time. *Nature* 491, 444–448. <https://doi.org/10.1038/nature11631>
- Johnson K.P., Shreve S.M., Smith V.S. (2012) Repeated adaptive divergence of microhabitat specialization in avian feather lice. *BMC Biology* 10, 52. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-52>
- Kaunisto S., Harkonen L., Rantala M.J., Kortet R. (2015) Early-life temperature modifies adult encapsulation response in an invasive ectoparasite. *Parasitology* 142(10), 1290–1296. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000591>
- Kemper H. (1951) Beobachtungen an *Crataerina pallida* Latr. und *Melophagus ovinus* L. (Diptera, Pupipara). *Zeitschrift für Hygiene (Zoologie)* 39, 225–259.
- Kocianová E., Rusňáková Taragel'ová V., Haruštiaková D., Špitalská E. (2017) Seasonal infestation of birds with immature stages of *Ixodes ricinus* and *Ixodes arboricola*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 8(3), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.01.006>
- Kołodziej-Sobocińska M. (2019) Factors affecting the spread of parasites in populations of wild European terrestrial mammals. *Mammal Research* 64, 301–318. <https://doi.org/10.1007/s13364-019-00423-8>

- Keve G., Csörgő T., Kováts D., et al. (2024) Contributions to our knowledge on avian louse flies (Hippoboscidae: Ornithomyinae) with the first European record of the African species *Ornithoctona laticornis*. *Parasites & Vectors* 17, 237. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06303-8>
- Lehikoinen A., Pohjola P., Valkama J., Mutanen M., Pohjoismäki J.L.O. (2021) Promiscuous specialists: host specificity patterns among generalist louse flies. *PLOS ONE* 16(5), e0247698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247698>
- Marshall A.G. (1981) *The ecology of ectoparasitic insects*. Academic Press.
- Mbora D.N.M., McPeck M.A. (2009) Host density and human activities mediate increased parasite prevalence and richness in primates threatened by habitat loss and fragmentation. *Journal of Animal Ecology* 78, 210–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01481.x>
- McDevitt-Galles T., Carpenter S.A., Koprivnikar J., Johnson P.T.J. (2021) How predator and parasite size interact to determine consumption of infectious stages. *Oecologia* 197(3), 551–564. <https://doi.org/10.1007/s00442-021-05010-w>
- Minias P., Włodarczyk R. (2020) Avian developmental rates are constrained by latitude and migratoriness: a global analysis. *Journal of Biogeography* 47(10), 2218–2229. <https://doi.org/10.1111/jbi.13923>
- Moyer B.R., Drown D.M., Clayton D.H. (2002) Low humidity reduces ectoparasite pressure: implications for host life history evolution. *Oikos* 97(2), 223–228. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.970208.x>
- Møller A.P. (1989) Parasites, predators and nest-boxes: facts and artefacts in nest-box studies of birds? *Oikos* 56(3), 421–423. <https://doi.org/10.2307/3565628>
- Mundry R., Nunn C.L. (2008) Stepwise model fitting and statistical inference: turning noise into signal pollution. *The American Naturalist* 173, 119–123.
- Oboňa J., Sychra O., Greš S., Heřman P., Manko P., Roháček J., Šestáková A., Šlapák J., Hromada M. (2019) A revised annotated checklist of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) from Slovakia. *ZooKeys* 862, 129–152. <https://doi.org/10.3897/zookeys.862.25992>
- Orlofske S.A., Jadin R.C., Johnson P.T. (2015) It's a predator-eat-parasite world: how characteristics of predator, parasite and environment affect consumption. *Oecologia* 178(2), 537–547. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3243-4>

Poulin R. (1995) *Evolutionary ecology of parasites: a review of parasitism in wild animal populations*. Chapman & Hall.

Poulin R. (2007) *Evolutionary ecology of parasites* (2nd ed.). Princeton University Press, Princeton.

Price R.D., Hellenthal R.A., Palma R.L., Johnson K.P., Clayton D.H. (2003) *The chewing lice: world checklist and biological overview*. Illinois Natural History Survey Special Publication.

Rewicz T., Móra A., Tończyk G., Szymczak A., Grabowski M., Calleja E.J., Perneckner B., Csabai Z. (2021) First records raise questions: DNA barcoding of Odonata in the middle of the Mediterranean. *Genome* 64(3), 196–206. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0226>

Roy V. (2020) Convergence diagnostics for Markov chain Monte Carlo. *Annual Review of Statistics and Its Application* 7, 387–412. <https://doi.org/10.1146/annurev-statistics-031219-041237>

Santolíkova A., Brzoňová J., Čepička I., Svobodová M. (2022) Avian louse flies and their trypanosomes: new vectors, new lineages and host–parasite associations. *Microorganisms* 10, 584. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030584>

Shilereyo M., Magige F., Ranke P.S., Ogutu J.O., Røskaft E. (2022) Ectoparasite load of small mammals in the Serengeti Ecosystem: effects of land use, season, host species, age, sex and breeding status. *Parasitology Research* 121(3), 823–838. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07439-1>

Shuai L.Y., Wu D., Wei W., Xu L., Wei W., Wang D.H. (2022) Ecological correlates of ectoparasite load in a rodent: complex roles of seasonality. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases* 2, 100057. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2022.100057>

Snow D.W., Perrins C.M. (1998) *The birds of the western Palearctic (concise edition)* (vol. 1–2). Oxford University Press, Oxford.

Šujanová A., Špitalská E., Václav R. (2021) Seasonal dynamics and diversity of haemosporidians in a natural woodland bird community in Slovakia. *Diversity* 13(9), 439. <https://doi.org/10.3390/d13090439>

Tobias J.A., Sheard C., Pigot A.L., Devenish A.J.M., Yang J., Sayol F., et al. (2022) AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds. *Ecology Letters* 25, 581–597. <https://doi.org/10.1111/ele.13898>

- Tobias J.A., Pigot A.L. (2019) Integrating behaviour and ecology into global biodiversity conservation strategies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 374(1781), 20190012. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0012>
- Turcotte A., Bélisle M., Pelletier F., Garant D. (2018) Environmental determinants of haemosporidian parasite prevalence in a declining population of tree swallows. *Parasitology* 145(7), 961–970. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002128>
- van Hoesel W., Santiago-Alarcon D., Marzal A., Renner S.C. (2020) Effects of forest structure on the interaction between avian hosts, dipteran vectors and haemosporidian parasites. *BMC Ecology* 20, 47. <https://doi.org/10.1186/s12898-020-00315-5>
- Vázquez D.P., Poulin R., Krasnov B.R., Shenbrot G.I. (2005) Species abundance and the distribution of specialization in host–parasite interaction networks. *Journal of Animal Ecology* 74(5), 946–955. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2005.00992.x>
- Vilela B., Villalobos F. (2015) letsR: a new R package for data handling and analysis in macroecology. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 1229–1234. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12401>
- Zduniak M., Serafini S., Wróbel A., Zwolak R. (2023) Host body mass, not sex, affects ectoparasite loads in yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*. *Parasitology Research* 122(11), 2599–2607. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07958-5>

Table 1 Associations of total louse flies prevalence with host traits among migrating birds (full dataset: n = 157 avian species). Coefficient estimates and corresponding 95% credibility limits (CL) were derived from phylogenetically-informed Bayesian mixed models (full and reduced). Significant coefficients are bolded.

Predictor	Estimate	Lower 95% CL	Upper 95% CL	p
<i>Full model</i>				
Intercept	-2.660	-6.622	1.328	0.190
Adult birds	0.169	-1.436	1.888	0.832
Date	0.005	-0.006	0.015	0.356
Log body mass	0.669	0.015	1.565	0.072
Log clutch size	-0.299	-1.283	0.642	0.542
Breeding latitude	0.013	-0.018	0.044	0.422
Migration distance	-0.0001	-0.0003	0.000	0.020
Annual mean temperature	0.004	-0.005	0.012	0.356
Annual mean precipitation	-0.005	-0.008	-0.0015	0.008
Habitat: Grassland	-1.203	-2.576	-0.043	0.052
Habitat: Other	-0.360	-1.501	0.707	0.532
Habitat: Shrubland	-0.518	-1.337	0.390	0.236
Habitat: Woodland	-1.021	-1.920	-0.353	0.016
Trophic niche: Aquatic predator	-1.602	-3.560	0.212	0.118
Trophic niche: Herbivore	-1.360	-2.945	0.537	0.140
Trophic niche: Invertivore	-0.931	-2.289	0.29	0.176
Trophic niche: Omnivore	-1.652	-3.017	-0.135	0.040
Nest: Open elevated	0.282	-0.36	0.901	0.366
Nest: Open ground	0.351	-0.75	1.500	0.556
<i>Reduced model</i>				
Intercept	-1.937	-5.257	1.403	0.238
Log body mass	0.908	0.212	1.678	0.014
Migration distance	-0.0001	-0.0002	0.000	0.020
Annual mean precipitation	-0.004	-0.007	-0.002	0.002
Habitat: Grassland	-1.258	-2.481	-0.166	0.030
Habitat: Other	-0.733	-2.830	0.330	0.174
Habitat: Shrubland	-0.445	-1.226	0.600	0.326
Habitat: Woodland	-1.181	-1.900	-0.521	0.002
Trophic niche: Aquatic predator	-1.727	-3.395	0.371	0.106
Trophic niche: Herbivore	-1.217	-2.800	0.376	0.146
Trophic niche: Invertivore	-0.910	-2.066	0.294	0.150
Trophic niche: Omnivore	-1.507	-2.839	-0.200	0.040

Table 2 Associations of *Ornithomya avicularia* prevalence with host traits among migrating birds (full dataset: n = 157 avian species). Coefficient estimates and corresponding 95% credibility limits (CL) were derived from phylogenetically-informed Bayesian mixed models (full and reduced). Significant coefficients are bolded.

Predictor	Estimate	Lower 95% CI	Upper 95% CI	p
<i>Full model</i>				
Intercept	-4.322	-10.050	0.774	0.110
Age (proportion adult birds)	-0.393	-2.767	2.051	0.796
Date	-0.005	-0.022	0.014	0.600
Log body mass	2.454	1.323	3.557	<0.001
Log clutch size	-0.577	-2.009	0.911	0.446
Breeding latitude	0.012	-0.041	0.074	0.700
Migration distance	-0.0002	-0.0004	-0.00001	0.052
Annual mean temperature	0.003	-0.011	0.018	0.748
Annual mean precipitation	-0.006	-0.012	-0.0005	0.028
Habitat: Grassland	-1.142	-3.327	0.501	0.202
Habitat: Other	-0.630	-2.786	1.471	0.552
Habitat: Shrubland	-0.555	-2.037	1.074	0.530
Habitat: Woodland	-0.958	-2.269	0.508	0.216
Trophic niche: Aquatic predator	-1.705	-4.492	0.716	0.186
Trophic niche: Herbivore	-1.148	-3.534	1.369	0.366
Trophic niche: Invertivore	-0.604	-2.511	1.023	0.492
Trophic niche: Omnivore	-1.141	-3.062	0.677	0.226
Nest: Open elevated	1.020	-0.227	2.343	0.108
Nest: Open ground	1.495	-0.361	3.371	0.126
<i>Reduced model</i>				
Intercept	-5.662	-10.590	-1.433	0.032
Log body mass	2.499	1.495	3.527	<0.001
Migration distance	-0.0002	-0.0004	0.00003	0.070
Annual mean precipitation	-0.006	-0.010	-0.001	0.004
Habitat: Grassland	-1.281	-2.973	0.707	0.166
Habitat: Other	-0.593	-2.760	1.268	0.584
Habitat: Shrubland	-0.444	-1.910	0.963	0.534
Habitat: Woodland	-1.088	-2.136	-0.002	0.050
Trophic niche: Aquatic predator	-1.680	-4.276	0.753	0.180
Trophic niche: Herbivore	-1.160	-3.817	1.059	0.358
Trophic niche: Invertivore	-0.624	-2.170	1.082	0.432
Trophic niche: Omnivore	-1.111	-2.955	0.601	0.198
Nest: Open elevated	1.067	0.005	2.315	0.068
Nest: Open ground	1.407	-0.393	3.234	0.126

Table 3 Associations of *Ornithomya fringillina* prevalence with host traits among migrating birds (full dataset: n = 157 avian species). Coefficient estimates and corresponding 95% credibility limits (CL) were derived from phylogenetically-informed Bayesian mixed models (full and reduced). Significant coefficients are bolded.

Predictor	Estimate	Lower 95% CI	Upper 95% CI	p
<i>Full model</i>				
Intercept	-1.098	-6.030	4.007	0.680
Age (proportion adult birds)	-0.125	-2.798	2.498	0.952
Date	0.001	-0.015	0.017	0.892
Log body mass	-2.406	-3.983	-0.979	0.010
Log clutch size	-0.861	-2.296	0.723	0.254
Breeding latitude	0.026	-0.009	0.065	0.140
Migration distance	-0.0002	-0.0004	-0.00003	0.016
Annual mean temperature	0.008	-0.007	0.023	0.300
Annual mean precipitation	-0.005	-0.011	0.001	0.106
Habitat: Grassland	0.329	-1.689	2.548	0.794
Habitat: Other	-2.090	-5.129	0.689	0.094
Habitat: Shrubland	-0.214	-1.392	0.913	0.688
Habitat: Woodland	-1.696	-3.004	-0.551	0.014
Trophic niche: Aquatic predator	-3.278	-9.774	1.957	0.228
Trophic niche: Herbivore	1.780	-1.054	5.164	0.258
Trophic niche: Invertivore	1.705	-0.878	5.024	0.230
Trophic niche: Omnivore	1.617	-1.351	4.648	0.268
Nest: Open elevated	0.178	-0.824	1.145	0.734
Nest: Open ground	-0.174	-1.868	1.709	0.880
<i>Reduced model</i>				
Intercept	-2.130	-6.501	1.645	0.352
Log body mass	-1.914	-3.189	-0.630	<0.001
Breeding latitude	0.013	-0.015	0.043	0.360
Migration distance	-0.0002	-0.0003	-0.00005	0.010
Annual mean precipitation	-0.002	-0.006	0.001	0.180
Habitat: Grassland	-0.401	-1.918	1.245	0.616
Habitat: Other	-2.597	-4.937	-0.443	0.010
Habitat: Shrubland	-0.451	-1.581	0.488	0.356
Habitat: Woodland	-2.288	-3.200	-1.376	<0.001
Trophic niche: Aquatic predator	-3.794	-7.836	0.389	0.074
Trophic niche: Herbivore	1.304	-1.261	4.258	0.376
Trophic niche: Invertivore	1.109	-1.283	3.950	0.414
Trophic niche: Omnivore	1.105	-1.514	3.936	0.440

Figure 1 Distribution of louse fly taxa across avian hosts. Green bars– *Ornithomya avicularia*, yellow bars – *O. fringillina*, blue bars – all louse fly species combined. Both photos were taken at the same magnification.

Figure 2 Associations of residual louse fly prevalence with host migration distance (A), annual mean precipitation (B), breeding habitat (C) and trophic niche (D), as assessed with phylogenetically-informed Bayesian mixed models (model results shown in Table 1). Regression lines with 95% confidence intervals (grey ribbon) are shown in panels A and B, while means (central point), SE (box) and 95% confidence intervals (whiskers) are shown in panels C and D.

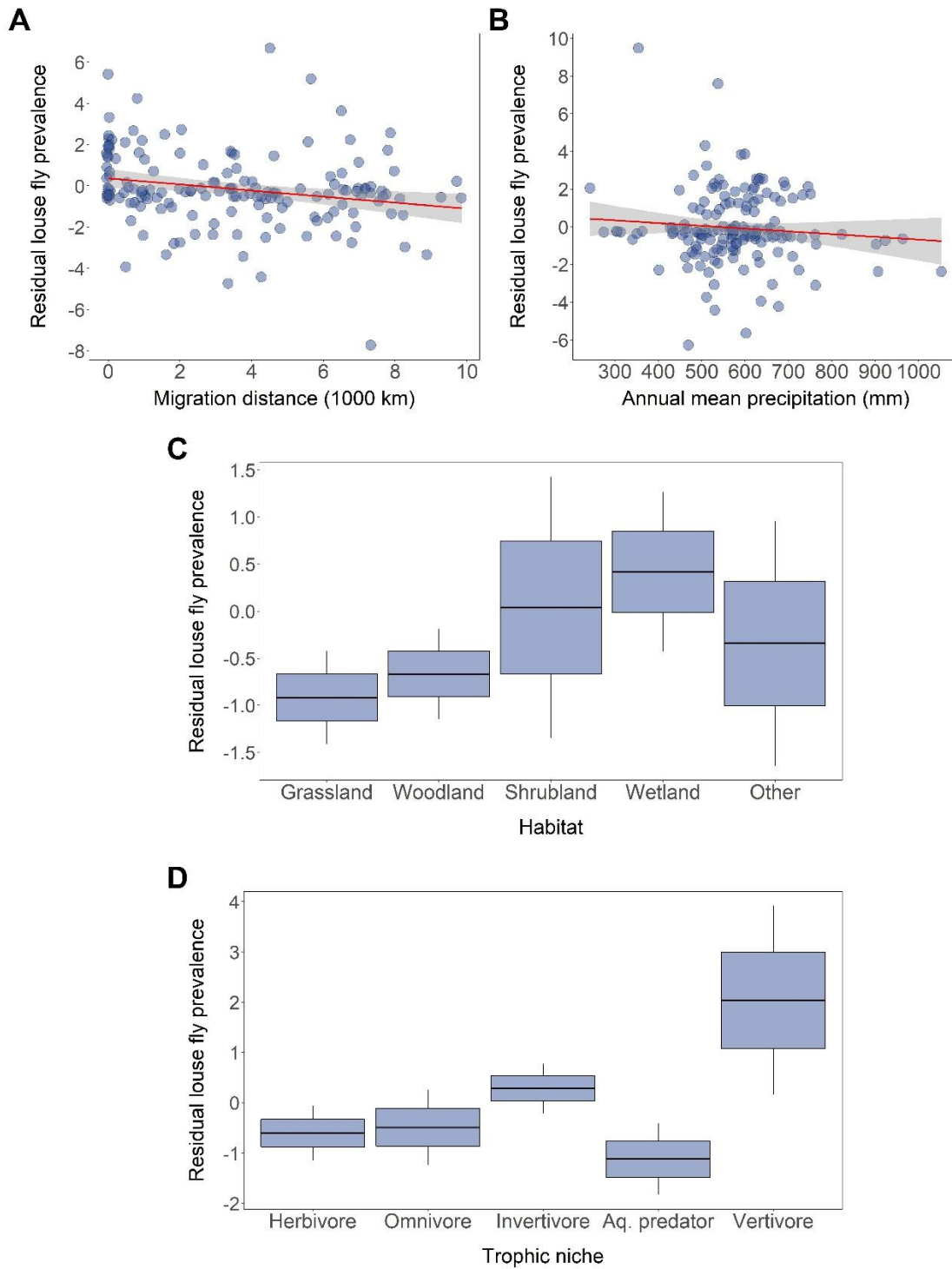
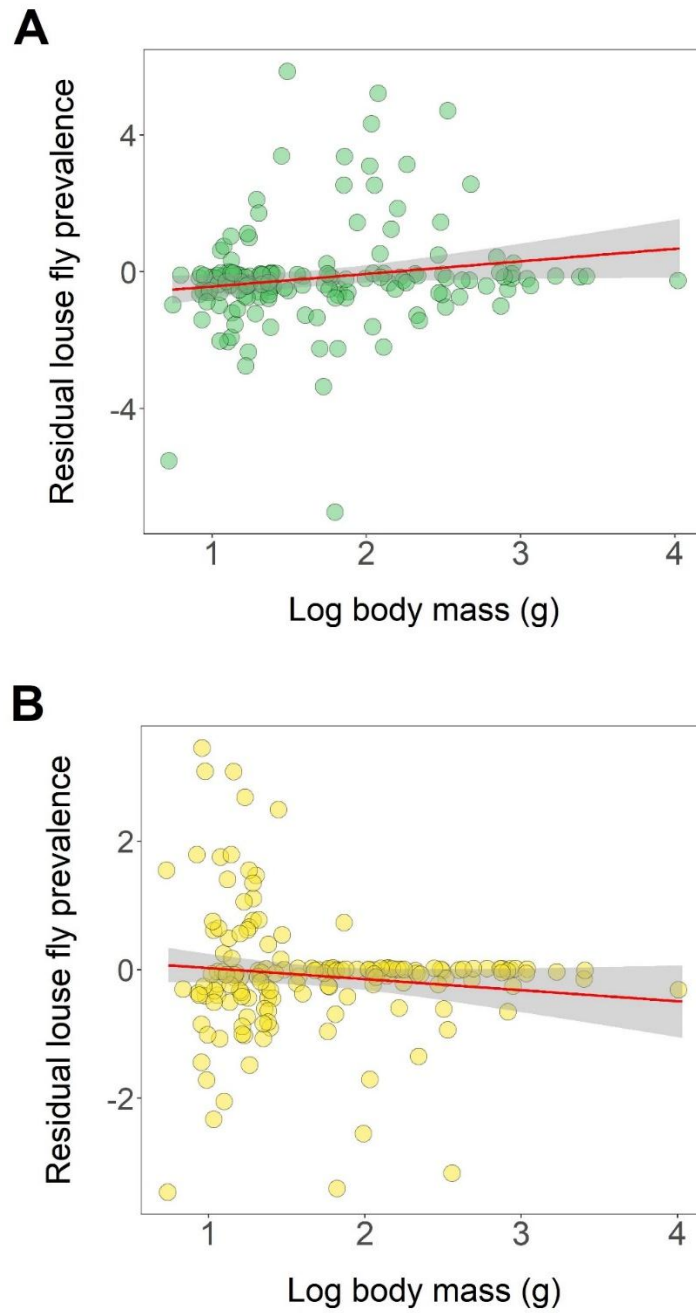


Figure 3 Associations of residual *Ornithomya avicularia* (A) and *O. fringillina* (B) prevalence with host body mass, as assessed with Bayesian mixed models (model results shown in Table 2 and 3). Regression lines with 95% confidence intervals (grey ribbon) are shown.



Electronic Supplementary Material

Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds

Table S1 Associations of total louse fly prevalence with host traits among migrating birds (subsamped dataset: n = 105 avian species with at least 10 individuals screened). Coefficient estimates and corresponding 95% credibility limits (CL) were derived from phylogenetically-informed Bayesian mixed models (full and reduced). All categorical variables were coded relative to the following reference levels: Wetland for habitat, Vertivore for trophic niche, and Cavity for nest type. Significant coefficients are marked in bold.

Predictor	Estimate	Lower 95% CL	Upper 95% CL	p
<i>Full model</i>				
Intercept	-1.904	-6.208	2.304	0.372
Proportion adult birds	1.392	-0.603	3.658	0.196
Date	0.005	-0.006	0.017	0.382
Log body mass	0.560	-0.240	1.530	0.208
Log clutch size	-0.312	-1.397	0.656	0.552
Breeding latitude	0.015	-0.017	0.048	0.354
Migration distance	-0.0001	-0.0003	0.000	0.018
Annual mean temperature	0.007	-0.003	0.017	0.172
Annual mean precipitation	-0.006	-0.011	-0.002	0.006
Habitat: Grassland	-0.946	-2.596	0.490	0.216
Habitat: Other	-0.184	-1.518	0.908	0.776
Habitat: Shrubland	-0.376	-1.291	0.519	0.404
Habitat: Woodland	-0.877	-1.712	-0.023	0.064
Trophic niche: Aquatic predator	-1.719	-3.718	0.634	0.0146
Trophic niche: Herbivore	-1.719	-3.718	0.634	0.146
Trophic niche: Invertivore	-1.406	-3.370	0.570	0.172
Trophic niche: Omnivore	-1.740	-3.224	-0.309	0.030
Nest: Open elevated	0.213	-0.532	0.831	0.536
Nest: Open ground	0.129	-1.114	1.403	0.856
<i>Reduced model</i>				
Intercept	-0.988	-4.867	2.526	0.614
Percent of adult birds	1.583	-0.601	3.650	0.152
Log body mass	0.683	-0.116	1.456	0.080
Migration distance	0.000	0.000	0.000	0.070
Annual mean temperature	0.004	-0.004	0.014	0.322
Annual mean precipitation	-0.006	-0.010	-0.002	0.004
Habitat: Grassland	-0.947	-2.424	0.337	0.162
Habitat: Other	-0.454	-1.528	0.619	0.412
Habitat: Shrubland	-0.342	-1.192	0.571	0.446
Habitat: Woodland	-0.970	-1.750	-0.103	0.028
Trophic niche: Aquatic predator	-1.898	-3.983	0.223	0.084
Trophic niche: Herbivore	-1.383	-3.220	0.562	0.152
Trophic niche: Invertivore	-1.174	-2.631	0.334	0.120
Trophic niche: Omnivore	-1.688	-3.382	-0.3433	0.046

Table S2 Associations of *Ornithomya avicularia* prevalence with host traits among migrating birds (subsampled dataset: n = 105 avian species with at least 10 individuals screened). Coefficient estimates and corresponding 95% credibility limits (CL) were derived from phylogenetically-informed Bayesian mixed models (full and reduced). All categorical variables were coded relative to the following reference levels: Wetland for habitat, Vertivore for trophic niche, and Cavity for nest type. Significant coefficients are marked in bold.

Predictor	Estimate	Lower 95% CL	Upper 95% CL	p
<i>Full model</i>				
Intercept	-3.204	-8.621	2.719	0.274
Adult birds	1.867	-1.724	5.643	0.328
Date	-0.005	-0.026	0.014	0.622
Log body mass	2.720	1.420	4.036	<0.001
Log clutch size	-0.510	-2.071	1.243	0.512
Breeding latitude	0.003	-0.057	0.077	0.934
Migration distance	-0.0002	-0.0005	0.00005	0.128
Annual mean temperature	0.007	-0.010	0.029	0.476
Annual mean precipitation	-0.008	-0.016	0.00003	0.032
Habitat: Grassland	-0.713	-3.136	1.484	0.552
Habitat: Other	-0.136	-2.356	2.146	0.964
Habitat: Shrubland	-0.248	-1.942	1.669	0.798
Habitat: Woodland	-0.848	-2.570	0.680	0.288
Trophic niche: Aquatic predator	-1.517	-4.555	1.154	0.296
Trophic niche: Herbivore	-1.669	-4.268	1.369	0.274
Trophic niche: Invertivore	-0.633	-2.722	1.313	0.520
Trophic niche: Omnivore	-1.141	-3.140	1.005	0.258
Nest: Open elevated	0.993	-0.366	2.361	0.150
Nest: Open ground	1.131	-0.877	3.646	0.322
<i>Reduced model</i>				
Intercept	-5.282	-9.541	-0.340	0.036
Log body mass	2.794	1.807	4.008	<0.001
Migration distance	-0.0002	-0.0003	0.00001	0.052
Annual mean precipitation	-0.008	-0.013	-0.004	0.002
Nest: Open elevated	1.187	0.000	2.350	0.046
Nest: Open ground	1.336	-0.505	3.130	0.142

Table S3 Associations of *Ornithomya fringillina* prevalence with host traits among migrating birds (subsamped dataset: n = 105 avian species with at least 10 individuals screened). Coefficient estimates and corresponding 95% credibility limits (CL) were derived from phylogenetically-informed Bayesian mixed models (full and reduced). All categorical variables were coded relative to the following reference levels: Wetland for habitat, Vertivore for trophic niche, and Cavity for nest type. Significant coefficients are marked in bold.

Predictor	Estimate	Lower 95% CI	Upper 95% CI	p
<i>Full model</i>				
Intercept	-0.930	-6.058	3.904	0.724
Adult birds	0.508	-2.896	3.510	0.710
Date	0.001	-0.013	0.018	0.910
Log body mass	-2.314	-3.757	-0.751	0.002
Log clutch size	-0.716	-2.254	0.965	0.380
Breeding latitude	0.026	-0.011	0.065	0.174
Migration distance	-0.0002	-0.0004	-0.00005	0.020
Annual mean temperature	0.009	-0.006	0.023	0.220
Annual mean precipitation	-0.005	-0.011	0.001	0.120
Habitat: Grassland	0.525	-1.881	3.001	0.684
Habitat: Other	-2.228	-4.977	-0.096	0.062
Habitat: Shrubland	-0.191	-1.428	0.965	0.698
Habitat: Woodland	-1.774	-3.046	-0.560	0.006
Trophic niche: Aquatic predator	-3.067	-7.845	1.145	0.158
Trophic niche: Herbivore	1.200	-1.825	4.063	0.424
Trophic niche: Invertivore	1.185	-1.827	3.920	0.394
Trophic niche: Omnivore	1.058	-1.835	3.932	0.462
Nest: Open elevated	0.136	-0.795	1.051	0.796
Nest: Open ground	-0.504	-2.467	1.427	0.616
<i>Reduced model</i>				
Intercept	-1.337	-5.881	2.704	0.554
Log body mass	-2.116	-3.555	-0.896	<0.001
Breeding latitude	0.027	-0.012	0.056	0.114
Migration distance	-0.0002	-0.0003	-0.00003	0.026
Annual mean temperature	0.011	-0.001	0.024	0.092
Annual mean precipitation	-0.006	-0.012	0.000	0.044
Habitat: Grassland	-0.070	-1.837	1.647	0.964
Habitat: Other	-2.365	-4.581	0.038	0.030
Habitat: Shrubland	-0.265	-1.352	0.800	0.640
Habitat: Woodland	-1.802	-2.925	-0.522	0.010
Trophic niche: Aquatic predator	-3.540	-8.282	0.943	0.120
Trophic niche: Herbivore	1.291	-1.850	4.250	0.388
Trophic niche: Invertivore	0.897	-1.686	4.000	0.526

12. Oświadczenia współautorów prac

Łódź, 23.09.2025.

Mgr Aleksandra Janiszewska

Katedra Badania Różnorodności Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki

Ul. Banacha 1/3

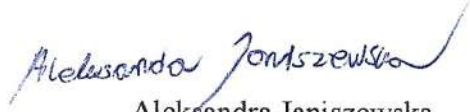
90-237 Łódź

Oświadczenia o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Maciej Bartos, Łukasz Trębicki, Magdalena Remisiewicz, Grzegorz Cierlik, Piotr Minias, Tomasz Rewicz 2023. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies.” jestem wiodącym autorem, a mój wkład polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu, analizie danych oraz przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Swój udział oceniam na 50%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” jestem wiodącym autorem, a mój wkład polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu, analizie danych, przygotowaniu baz danych oraz przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Swój udział oceniam na 50%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Dariusz Jakubas, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos, Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds” (praca w trakcie recenzji) jestem wiodącym autorem, a mój wkład polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu, analizie danych, przygotowaniu baz danych oraz przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Swój udział oceniam na 55%.


Aleksandra Janiszewska

Lódź, 29.01.2024²⁰²⁵ Fiutek

Mgr Patryk Fiutek
Wojska Polskiego 32,
42-310 Przybynów

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.

Patryk Fiutek
Patryk Fiutek

Łódź, 29.01.2025.

Dr Hanna Sztwiertnia
Śląskie Towarzystwo Ornitologiczne
(50-335 Wrocław, ul. Sienkiewicza 21)
Mail: hanna.sztw@gmail.com

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiertnia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.

Hanna Sztwiertnia



Warszawa, 29.01.2025 r.

Mgr inż. Jan Rapczyński
Wydział Leśny
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Nowoursynowska 166
02-787 Warszawa

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.


Jan Rapczyński

Łódź, 29.01.2025.

Dr Tomasz Rewicz
Katedra Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, nadzorowaniu prac laboratoryjnych i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 10%.


Tomasz Rewicz

Gdańsk, 29.01.2025

prof. hab. Dariusz Jakubas
Katedra Ekologii i Zoologii Kręgowców
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-309 Gdańsk

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2025. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.

Dariusz Jakubas



Łódź, 23.09.2025.

prof. dr hab. Piotr Minias

Katedra Badania Różnorodności Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki

Ul. Banacha 1/3

90-237 Łódź

Oświadczenia o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Maciej Bartos, Łukasz Trębicki, Magdalena Remisiewicz, Grzegorz Cierlik, Piotr Minias, Tomasz Rewicz 2023. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies.” mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu analiz statystycznych oraz zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu. Swój udział oceniam na 10%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu analiz statystycznych oraz zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu. Swój udział oceniam na 10%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Dariusz Jakubas, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos, Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds” (praca w trakcie recenzji) mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu analiz statystycznych oraz zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu. Swój udział oceniam na 15%.



Piotr Minias

Łódź, 23.09.2025.

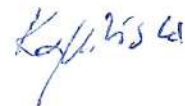
Dr Maciej Kamiński
Katedra Badania Różnorodności Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Ul. Banacha 1/3
90-237 Łódź

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 2%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Dariusz Jakubas, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos, Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” (praca w trakcie recenzji) mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu. Swój udział oceniam na 3%.

Maciej Kamiński



Łódź, 23.09.2025.

Dr hab. Radosław Włodarczyk, prof. UŁ
Katedra Badania Różnorodności Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Ul. Banacha 1/3
90-237 Łódź

Oświadczenie o udziale w publikacjach

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Dariusz Jakubas, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos, Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds” (praca w trakcie recenzji) mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.



Radosław Włodarczyk

Łódź, 23.09.2025.

prof. dr hab. Maciej Bartos, prof. UŁ

Katedra Badania Różnorodności Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki

Ul. Banacha 1/3

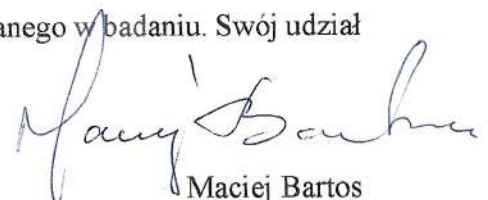
90-237 Łódź

Oświadczenia o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Maciej Bartos, Łukasz Trębicki, Magdalena Remisiewicz, Grzegorz Cierlik, Piotr Minias, Tomasz Rewicz 2023. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies.” mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu analiz statystycznych oraz zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu. Swój udział oceniam na 10%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu analiz statystycznych oraz zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu. Swój udział oceniam na 10%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Dariusz Jakubas, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos, Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds” (praca w trakcie recenzji) mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu, nadzorowaniu analiz statystycznych oraz zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu. Swój udział oceniam na 15%.


Maciej Bartos

Wrocław, 22.09.2025

Dr Hanna Sztwiertnia
Śląskie Towarzystwo Ornitologiczne,
ul. Sienkiewicza 21,
50-335 Wrocław

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Dariusz Jakubas, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiertnia, Maciej Bartos, Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds” (praca w trakcie recenzji) mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.



Hanna Sztwiertnia

Gdańsk, 22.09.2025.

prof. dr hab. Dariusz Jakubas
Katedra Ekologii i Zoologii Kręgowców
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-309 Gdańsk

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Dariusz Jakubas, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiertnia, Maciej Bartos, Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds” (praca w trakcie recenzji) mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu oraz przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.

Dariusz Jakubas



Łódź, 23.09.2025.

Dr Tomasz Rewicz
Katedra Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Maciej Bartos, Łukasz Trębicki, Magdalena Remisiewicz, Grzegorz Cierlik, Piotr Minias, Tomasz Rewicz 2023. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies.” mój udział polegał współtworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu manuskryptu oraz nadzorowaniu prac laboratoryjnych oraz analiz statystycznych. Swój udział oceniam na 10%.

Tomasz Rewicz
Tomasz Rewicz

Prof. dr hab. Magdalena Remisiewicz
Stacja Badania Wędrówek Ptaków
Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
Ul. Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

Oświadczenia o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Maciej Bartos, Łukasz Trębicki, Magdalena Remisiewicz, Grzegorz Cierlik, Piotr Minias, Tomasz Rewicz 2023. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies.” mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 5%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Tomasz Rewicz, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Patryk Fiutek, Dariusz Jakubas, Jan Rapczyński, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos 2024. Host-related genetic differentiation of a polyxenic avian ectoparasite, *Ornithomya avicularia* (Hippoboscidae)” mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Piotr Minias, Radosław Włodarczyk, Maciej Kamiński, Dariusz Jakubas, Magdalena Remisiewicz, Hanna Sztwiernia, Maciej Bartos, Louse flies on the fly: host macroecology shapes inter-specific variation in ectoparasite prevalence among migrating birds” (praca w trakcie recenzji) mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 3%.

KIEROWNIK
Stacji Badania Wędrówek Ptaków

prof. dr hab. Magdalena Remisiewicz

Stacja Badania
Wędrówek Ptaków

tel. +48 58 523 61 54
tel. +48 58 523 61 55
e-mail: sbwp@ug.edu.pl

Wydział Biologii UG
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk



Kraków, 11.09.2025

mgr Grzegorz Cierlik
os. Tysiąclecia 22/62
31-607 Kraków

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Maciej Bartos, Łukasz Trębicki, Magdalena Remisiewicz, Grzegorz Cierlik, Piotr Minias, Tomasz Rewicz 2023. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies.” mój udział polegał na zbieraniu materiału biologicznego wykorzystanego w badaniu i przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 5%.



Grzegorz Cierlik

Łódź, 23.09.2025.

Dr Lukasz Trębicki
Katedra Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

Oświadczenie o udziale w publikacji

Oświadczam, że w pracy „Aleksandra Janiszewska, Maciej Bartos, Lukasz Trębicki, Magdalena Remisiewicz, Grzegorz Cierlik, Piotr Minias, Tomasz Rewicz 2023. Development of a novel molecular tool to study molecular ecology of *Ornithomya* (Hippoboscidae) avian louse flies.” mój udział polegał na przygotowaniu manuskryptu, pracach laboratoryjnych oraz analizach statystycznych. Swój udział oceniam na 10%.

Lukasz Trębicki

