

**Prof. dr hab. Marcin Jan Kamiński, Ph.D.**

**Museum and Institute of Zoology**

Polish Academy of Sciences

Twarda 51/55, 00-818 Warsaw, Poland

**Review of the doctoral thesis “*Reconstructing Evolutionary Histories of Calliphoridae (Diptera: Cyclorrhapha: Oestroidea) at Different Taxonomic Levels Using Phylogenomic Methods*” authored by Drashti R. Parmar, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, and completed under the supervision of Prof. Krzysztof Szpila with co-supervision by Dr. Nikolas P. Johnston.**

The thesis submitted for evaluation concerns the molecular systematics of dipterans belonging to the blowfly family (Diptera: Calliphoridae). The body of the manuscript comprises 220 numbered pages and includes the following sections: *Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Bibliography, Table T1*, and the *Articles*. Additionally, the thesis contains the *Author’s Declaration, Acknowledgements, Abstracts* (in Polish and English), and a list of included publications. The entire thesis and the attached publications are written in English.

From a legal standpoint (Art. 187 of the Law on Higher Education and Science), the dissertation has a hybrid form, as the paginated chapters synthesize findings presented in three recently published scientific articles ([Parmar et al. 2025a](#), [b](#), [c](#)) as well as in an unpublished manuscript submitted to the journal *Molecular Biology and Evolution*. According to the authorship statements accompanying the publications and the initial *Author’s Declaration*, the Doctoral Candidate’s contribution to achieving the stated research objectives was substantial and encompassed conceptualization, methodology, formal analysis, writing, validation and visualization of results, and data curation. The journals selected by the Candidate for disseminating the outcomes of her research are reputable and widely recognized within the scientific community.

The research undertaken by the Candidate is original and provides much-needed genomic data on an economically important and taxonomically challenging lineage of insects. In addition to offering novel insights into the systematics of Calliphoridae Brauer & Bergenstamm, it also delivers a well-curated dataset for molecular species identification that

can be used by non-specialists in a variety of analyses. This is particularly valuable given that the research objectives were achieved using a genome-skimming approach, while the bioinformatic analyses focused on mitogenomic data.

Five clear goals, aligned with the included publications, are stated in the Introduction. These are: (1) to identify and address critical gaps in the knowledge of Calliphoridae; (2) to resolve subfamily- and genus-level relationships within the family; (3) to clarify species boundaries using integrative taxonomy; (4) to reconstruct parasitic traits within the phylogeny of Luciliinae; and (5) to establish a dated phylogeny of Calliphoridae.

The sequence of the presented papers is logical, well organized, and clearly aligned with these goals. The Candidate begins with a revisionary contribution analyzing available genomic data on blowflies ([Parmar et al. 2025a](#) – Article 1). This literature-based survey enabled a well-informed selection of operational taxonomic units for the subsequent studies. The paper identifies gaps in current genomic knowledge, summarizes inconsistencies among existing phylogenetic hypotheses for Calliphoridae, and discusses potential novel technologies that could support future taxonomic research. This contribution is highly appropriate and well suited for the thesis.

The second paper presents a structural and phylogenetic investigation of mitogenomes within the focal group ([Parmar et al. 2025b](#) – Article 2). Unlike the first contribution, this study is based on a comprehensive analysis of both newly generated and previously available genomic data, encompassing over 100 mitogenomes – the largest dataset ever investigated for Calliphoridae. The Candidate employs a wide array of bioinformatic tools (e.g., metaSPAdes, MEGAHIT) to assemble, annotate, and analyze the data. Prior to phylogenetic inference, she provides a detailed structural characterization of the recovered mitogenomes, including base composition, codon usage, and protein-coding gene evolutionary rates. This section is carefully developed and richly illustrated, offering a robust foundation for future studies on this medically and economically important group.

The phylogenetic analyses incorporate all 13 protein-coding genes (PCGs). A total of 107 mitogenomes representing 84 Calliphoridae species and all eight subfamilies were included. The analyses were conducted using diverse and appropriate methodologies (IQ-Tree2, ExaBayes). The Candidate evaluates the resulting relationships with commendable caution, discussing problematic or weakly supported nodes in the context of relevant literature. The phylogenetic results presented in this study are substantial and will undoubtedly serve as an important reference point for both current and future researchers.

My only concern relates to the absence of taxonomic revisions that would be necessary to restore monophyly in several examined taxa. For example, why did the Candidate not propose the designation of a monophyletic lineage within the paraphyletic *Calliphora* Robineau-Desvoidy? Additionally, how does she interpret the non-sister relationship recovered for the two *Polleniopsis mongolica* Séguéy specimens (Fig. 5 in [Parmar et al. 2025b](#))?

The third contribution applies molecular-based species delimitation methods to investigate previously undetected *Calliphora* species from the Afrotropical and Palaearctic regions ([Parmar et al. 2025c](#) – Article 3). As in the preceding studies, the work relies on mitogenomic data; however, in contrast to the earlier papers, it employs Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) and Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP). The Candidate demonstrates a commendable level of critical thinking, grounding her conclusions in multiple lines of evidence (e.g., delimitation thresholds and morphological characters). The paper is well structured, effectively illustrated, and highlights the Candidate's competence in morphological work. Importantly, the study introduces two species new to science – in my opinion, an excellent application of the obtained classification results.

My comments concern the avoidance of decisive statements regarding the status of *Cynomya* Robineau-Desvoidy, which according to the presented topologies renders *Calliphora* paraphyletic. Additionally, the treatment of the enigmatic “*Calliphora* sp. n. 3” (Fig. S1) remains unclear. Why was this taxon not formally described given the available results? It seems to be a recurring issue in studies employing molecular species delimitation methods that the available data are not exploited to their full extent.

The fourth contribution is methodologically the most comprehensive and focuses on the phylogeny and evolutionary history of the subfamily Luciliinae Shannon ([Parmar et al., submitted](#) – Article 4). Using a large mitogenomic dataset – including 36 newly sequenced genomes – the Candidate investigates relationships within the focal taxon and examines the evolution of feeding strategies using Ancestral State Reconstruction techniques. The resulting phylogeny is time-calibrated using a Bayesian MCMC approach. The analyses reveal major inconsistencies in the currently accepted classification of the family, with the largest genus, *Lucilia* Robineau-Desvoidy, recovered as non-monophyletic. The subfamily is estimated to have originated in the middle Miocene, which has noteworthy evolutionary implications, particularly regarding feeding strategies – namely, multiple independent transitions toward obligate and facultative parasitism.

The methods employed span phylogenomics, biogeography, and evolutionary biology. They demonstrate the Candidate's creativity and ability to address complex research questions, providing a strong foundation for the development of her independent research career.

My only concern relates to the rather laconic style used to describe the calibration points implemented for time-dating the phylogeny. Although the Candidate provides this information in the supplementary materials (Table S1), the main manuscript does not make it clear whether the third and final calibration point is based on fossil or molecular evidence. The use of non-fossil calibration points should be explicitly justified, particularly in light of the scarce fossil record for Calliphoridae. Furthermore, it is unclear why the Candidate did not attempt to date the phylogeny using known evolutionary rates for selected mitochondrial loci. An outgroup-based calibration strategy might also have been appropriate to test the robustness of the inferred divergence times. I strongly recommend incorporating a second, independent calibration approach to validate the temporal framework obtained.

Additionally, the legends for Figs 1–2 (in [Parmar et al., submitted](#) – Article 4) should be corrected, as the colour coding does not currently reflect the classification. For example, Luciliinae are highlighted in green in the tree, whereas the legend indicates they should be shown in red.

Finally, the main body of the thesis, which links the individual papers, is clear and well conceived. The *Introduction* provides nearly all relevant background information (with the exception of fossil data). The *Methods* section is generally clear, although additional details regarding the specimens used – particularly the age of museum-derived individuals – would have been valuable. The *Results* are presented comprehensively and effectively summarize the content of the included papers. The *Discussion* aligns well with the *Introduction*, incorporates relevant literature, and appropriately directs the reader to the articles. The *Conclusions* highlight the major findings of the thesis, but they do not correspond directly to the stated goals, are presented in a different order, and partly duplicate content found in earlier sections. A bullet-point format might have been more suitable.

Overall, I find the thesis outstanding, particularly in its methodological rigor. The Candidate has applied a wide array of phylogenetic and evolutionary tools to shed light on longstanding problems within Calliphoridae. On the downside, I note a somewhat overly cautious interpretation of the results, which contributes to the widening gap between phylogeny and classification. Given the high quality of the findings, I would have expected more decisive taxonomic actions.

In conclusion, in my opinion the thesis presented by Ms. Drashti R. Parmar, entitled *“Reconstructing Evolutionary Histories of Calliphoridae (Diptera: Cyclorrhapha: Oestroidea) at Different Taxonomic Levels Using Phylogenomic Methods”* constitutes an original scientific contribution that significantly clarifies the phylogeny and evolution of this large dipteran group. The thesis not only meets but in many respects exceeds the requirements set for doctoral dissertations. Therefore, I respectfully request that the Biological Sciences Discipline Council of Nicolaus Copernicus University in Toruń accept this dissertation and allow its author to proceed to the next stages of the doctoral procedure. Moreover, in view of the originality of the results and the broad scope of the analyses undertaken, I propose that this dissertation be awarded distinction.

Marcin Jan Kamiński

**Prof. dr hab. Marcin Jan Kamiński**

**Muzeum i Instytut Zoologii PAN**

**Twarda 51/55, 00-818 Warszawa**

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Reconstructing Evolutionary Histories of Calliphoridae (Diptera: Cyclorrhapha: Oestroidea) at Different Taxonomic Levels Using Phylogenomic Methods”, autorstwa Drashti R. Parmar, wykonanej na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierunkiem prof. Krzysztofa Szpili, przy współpromotorstwie dr. Nikołasa P. Johnstona.**

Przedłożona do oceny rozprawa dotyczy systematyki molekularnej muchówek należących do rodziny plujkowatych (Diptera: Calliphoridae). Główna część maszynopisu liczy 220 numerowanych stron i obejmuje następujące rozdziały: *Wstęp*, *Materiał i Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski*, *Bibliografia*, *Tabela T1* oraz *Artykuły*. Ponadto rozprawa zawiera *Oświadczenie Autora*, *Podziękowania*, *Streszczenia* (w wersji polskiej i angielskiej) oraz wykaz załączonych publikacji. Całość rozprawy oraz dołączone do niej artykuły zostały przygotowane w języku angielskim.

Z prawnego punktu widzenia (Art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) rozprawa ma charakter hybrydowy, ponieważ jej paginowane rozdziały syntetyzują wyniki zaprezentowane w trzech już opublikowanych artykułach naukowych ([Parmar et al. 2025a, b, c](#)), a także w manuskrypcie przesłanym do redakcji czasopisma *Molecular Biology and Evolution*. Zgodnie z oświadczeniami współautorów oraz pierwotną *Deklaracją*, wkład Doktorantki w realizację założonych celów badawczych był znaczący i obejmował konceptualizację badań, opracowanie metodologii, analizy formalne, walidację i wizualizację wyników, udostępnianie i archiwizację danych oraz przygotowanie maszynopisów. Czasopisma wybrane przez Doktorantkę do publikacji wyników badań są renomowane i szeroko rozpoznawalne w środowisku naukowym.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę są oryginalne i dostarczają długo oczekiwanych danych genomowych dotyczących ekonomicznie istotnej i taksonomicznie zaniedbanej grupy owadów. Oprócz przedstawienia nowych ujęć systematyki Calliphoridae Brauer & Bergenstamm, rozprawa dostarcza również starannie przygotowanego zestawu danych do molekularnej identyfikacji gatunków, który może być wykorzystywany także

przez niespecjalistów, w tym przez środowiska zajmujące się ochroną przyrody. Jest to szczególnie wartościowe, ponieważ cele badawcze zostały osiągnięte w oparciu o technikę *genome skimming*, a analizy bioinformatyczne koncentrowały się na danych mitogenomicznych.

We Wstępie Doktorantka przedstawiła pięć jasno sformułowanych celów, spójnych z treścią i układem załączonych publikacji: (1) identyfikację i zaadresowanie kluczowych luk w wiedzy dotyczącej genomiki Calliphoridae; (2) analizę relacji filogenetycznych na poziomie podrodzin i rodzajów w obrębie badanej rodziny; (3) identyfikację nowych taksonów z wykorzystaniem metod taksonomii integratywnej; (4) rekonstrukcję ewolucji strategii żywieniowych w obrębie podrodziny Luciliinae; (5) osadzenie uzyskanej filogenezy w czasie geologicznym.

Układ przedstawionych prac jest logiczny i w sposób przejrzysty powiązany z celami rozprawy. Doktorantka rozpoczyna od publikacji przeglądowej analizującej dostępne dane genomowe dotyczące plujkowatych (Parmar et al. 2025a – Artykuł 1). To kompleksowe opracowanie umożliwiło świadomy dobór jednostek taksonomicznych w kolejnych analizach. Artykuł identyfikuje luki w istniejących danych genomowych, podsumowuje niespójności między dotychczasowymi hipotezami filogenetycznymi Calliphoridae oraz omawia potencjał nowych technologii, które mogą wspierać przyszłe badania taksonomiczne. W mojej opinii jest to praca trafnie wpisująca się w strukturę całej rozprawy.

Druga praca przedstawia analizę strukturalną i filogenetyczną mitogenomów w plujkowatych (Parmar et al. 2025b – Artykuł 2). W przeciwieństwie do poprzedniego artykułu, praca ta opiera się na obszernej analizie zarówno nowo wygenerowanych, jak i wcześniej dostępnych danych, obejmujących ponad 100 mitogenomów – największego dotychczas zbioru danych analizowanego dla Calliphoridae. Doktorantka stosuje szerokie spektrum narzędzi bioinformatycznych (np. metaSPAdes, MEGAHIT) do ich rekonstrukcji, anotacji i analizy. Przed przystąpieniem do omówienia wyników analiz filogenetycznych przedstawia szczegółową charakterystykę strukturalną mitogenomów, obejmującą skład nukleotydowy, użycie kodonów i tempo ewolucji genów kodujących białka. Ta część pracy została przygotowana bardzo starannie, jest bogato zilustrowana i z pewnością stanowi solidny fundament dla przyszłych badań nad tą medycznie i ekonomicznie ważną grupą owadów.

Przeprowadzone analizy filogenetyczne obejmują wszystkie 13 genów kodujących białka. Łącznie uwzględniono 107 mitogenomów reprezentujących 84 gatunki Calliphoridae oraz wszystkie osiem podrodzin. Analizy wykonano z użyciem różnorodnych i metodologicznie trafnych narzędzi (IQ-Tree2, ExaBayes). Doktorantka interpretuje uzyskane

wyniki z dużą ostrożnością, omawiając problematyczne lub słabo wsparte kłady w kontekście odpowiedniej literatury. Przedstawione wyniki filogenetyczne są znaczące i bez wątpienia staną się ważnym punktem odniesienia dla obecnych i przyszłych badaczy.

Moje jedyne zastrzeżenie dotyczy braku decyzji taksonomicznych, które byłyby niezbędne do przywrócenia monofiletyzmu kilku analizowanych taksonów. Na przykład, dlaczego Doktorantka nie zaproponowała wydzielenia monofiletycznych linii w obrębie parafiletycznego rodzaju *Calliphora* Robineau-Desvoidy? Ponadto, jak interpretuje ona brak relacji siostrzanej między dwoma okazami *Polleniopsis mongolica* Ségué (Fig. 5 w Parmar et al. 2025b)?

Trzecia praca wykorzystuje metody delimitacji gatunków oparte na danych molekularnych do identyfikacji wcześniej nierozpoznanych gatunków *Calliphora* z regionu afrotropikalnego i palearktycznego (Parmar et al. 2025c – Artykuł 3). Podobnie jak poprzednie publikacje, opiera się na danych mitogenomicznych, jednak w odróżnieniu od nich stosuje metody *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) oraz *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP). Doktorantka wykazała się tu wysokim poziomem krytycznej analizy danych, formułując wnioski w oparciu o wiele linii dowodowych, w tym cechy morfologiczne. Artykuł ma klarowną strukturę, jest bogato zilustrowany i ukazuje kompetencje Doktorantki w zakresie analizy danych morfologicznych. Praca wprowadza do światowej nomenklatury dwa nowe dla nauki gatunki z rodzaju *Calliphora*, co – w mojej opinii – stanowi trafną i wartościową implementację uzyskanych wyników.

Podobnie jak w przypadku poprzedniej pracy, również tutaj moje uwagi dotyczą unikania decyzji taksonomicznych na poziomie rodzajowym. Zgodnie z przedstawioną filogenezą, rodzaj *Cynomya* Robineau-Desvoidy czyni *Calliphora* taksonem niemonofiletycznym. Niejasne pozostaje również potraktowanie enigmatycznego taksonu „*Calliphora* sp. n. 3” (Fig. S1). Dlaczego nie został on formalnie opisany w świetle dostępnych wyników? Zjawisko niepełnego wykorzystania uzyskanych danych wydaje się zresztą częste w pracach stosujących metody delimitacji molekularnej.

Czwarta praca jest metodologicznie najobszerniejsza i koncentruje się na filogenezie oraz historii ewolucyjnej podrodziny Luciliinae Shannon (Parmar et al., submitted – Artykuł 4). Wykorzystując duży zestaw danych mitogenomicznych – w tym 36 nowo sekwencjonowanych genomów – Doktorantka bada relacje w obrębie tej grupy oraz analizuje ewolucję strategii pokarmowych przy użyciu metod rekonstrukcji stanów ancestralnych. Uzyskana filogeneza została osadzona w czasie geologicznym za pomocą podejścia bayesowskiego. Analizy ujawniają istotne niezgodności w obowiązującej klasyfikacji

rodziny, a najbardziej różnorodny rodzaj *Lucilia* Robineau-Desvoidy został zrekonstruowany jako niemonofiletyczny. Powstanie całej podrodziny datowane jest na środkowy miocen, co ma istotne implikacje ewolucyjne, zwłaszcza dla interpretacji wielokrotnych, niezależnych przejść ku pasożytnictwu obligatoryjnemu i fakultatywnemu.

Zastosowane metody czerpią z dorobku filogenomiki, biogeografii oraz biologii ewolucyjnej. Ich implementacja świadczy o kreatywności Doktorantki i jej zdolności do rozwiązywania złożonych problemów badawczych, stanowiąc solidną podstawę do rozwoju samodzielnej kariery naukowej.

Moje jedyne zastrzeżenie dotyczy dość lakonicznego stylu opisu punktów kalibracyjnych zastosowanych w datowaniu filogenezy. Choć Doktorantka umieściła te informacje w materiałach uzupełniających (Tabela S1), w głównym tekście nie jest jasne, czy trzeci i ostatni punkt kalibracyjny opiera się na danych kopalnych czy molekularnych. Zastosowanie kalibracji nieuwzględniającej skamieniałości wymaga wyraźnego uzasadnienia, na przykład poprzez wskazanie trudności związanych z ubogim zapisem kopalnym Calliphoridae. Ponadto nie wiadomo, dlaczego Doktorantka nie próbowała datować filogenezy z zastosowaniem alternatywnych technik, takich jak wykorzystanie tempa ewolucji poszczególnych loci mitochondrialnych czy strategii kalibracji opartej na grupach zewnętrznych. Zdecydowanie rekomenduję wprowadzenie drugiej, niezależnej strategii kalibracji w celu wzmocnienia wiarygodności uzyskanych wyników.

Dodatkowo legendy do rycin 1–2 (w Parmar et al., submitted – Artykuł 4) wymagają korekty, ponieważ obecne kodowanie kolorystyczne nie odpowiada klasyfikacji – przykładowo, Luciliinae oznaczono na wykresie kolorem zielonym, podczas gdy legenda wskazuje kolor czerwony.

Należy podkreślić, że zasadnicza część rozprawy, łącząca poszczególne artykuły, jest klarowna i dobrze przemyślana. Wstęp dostarcza niemal wszystkich informacji niezbędnych do interpretacji wyników (z wyjątkiem danych kopalnych). Rozdział *Materiał i Metody* jest przejrzysty, choć dodatkowe informacje dotyczące użytych okazów – szczególnie „wieku” osobników pochodzących z kolekcji muzealnych – byłyby pożądane. *Wyniki* zostały przedstawione w sposób wyczerpujący i skutecznie streszczają treść artykułów. *Dyskusja* dobrze koresponduje ze *Wstępem*, odwołuje się do kluczowej literatury i właściwie kieruje czytelnika do odpowiednich publikacji. *Wnioski* podkreślają główne osiągnięcia Doktorantki, jednak nie odnoszą się bezpośrednio do przedstawionych celów, są zaprezentowane w innej kolejności i częściowo powielają treści wcześniejszych rozdziałów. Bardziej odpowiednia byłaby ich prezentacja w formie punktowej.

Ogólnie omawianą rozprawę oceniam bardzo wysoko, zwłaszcza pod względem metodologicznym. Doktorantka zastosowała szeroki zestaw narzędzi filogenetycznych i ewolucyjnych do wyjaśnienia fundamentalnych problemów w systematyce Calliphoridae. Pewnym mankamentem pracy jest jednak zbyt ostrożny styl interpretacji wyników, który sprzyja pogłębianiu się luki między filogenezą a klasyfikacją. Biorąc pod uwagę wysoką jakość uzyskanych rezultatów, oczekiwałbym podjęcia przez Doktorantkę odważniejszych decyzji taksonomicznych.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska Pani Drashti R. Parmar pt. *„Reconstructing Evolutionary Histories of Calliphoridae (Diptera: Cyclorrhapha: Oestroidea) at Different Taxonomic Levels Using Phylogenomic Methods”* stanowi oryginalny wkład naukowy, który znacząco pogłębia wiedzę o filogenezie i ewolucji dużej grupy muchówek. Rozprawa nie tylko spełnia, lecz w wielu aspektach przekracza wymagania stawiane pracom doktorskim. Dlatego też wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej Autorki do kolejnych etapów postępowania doktorskiego. Ponadto, z uwagi na oryginalność wyników oraz szeroki zakres przeprowadzonych analiz, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Marcin Jan Kamiński