

SAMENVATTING

De diversiteit in vormen bij dieren en planten is het resultaat van de balans tussen ontwikkelings- en evolutionaire processen. Ontwikkeling vertaalt genotypen naar fenotypen en voorziet in de morfologische variatie tussen individuen waarop natuurlijke selectie aangrijpt. Vleugelpatronen bij vlinders vormen een ideaal onderwerp voor onderzoek naar de interacties tussen evolutie en ontwikkeling. Vlindervleugels vertonen een spectaculaire diversiteit in kleurpatronen, die het zichtbare resultaat zijn van natuurlijke selectie. Deze kunnen belangrijk zijn bij visuele communicatie met predatoren of bij partnerkeuze en staan vaak onder sterke selectiedruk. Bovendien kan de vorming van deze patronen tijdens de ontwikkeling van vlinders onderzocht worden op verschillende niveau's (bijvoorbeeld moleculair, cellulair en fysiologisch).

Veel onderzoek naar de evolutie van vleugelpatronen en de interactie tussen genetische variatie en ontwikkelingsmechanismen concentreert zich op de oogvlekken (concentrische ringen van verschillende kleuren) van de tropische vlindersoort *Bicyclus anynana*. In de oogvlekken langs de randen van de vleugels is in potentie veel variatie aanwezig (bijvoorbeeld in het aantal, de kleurverdeling, de vorm en grootte van de oogvlekken). Echter, de genetische variatie in de morfologie van oogvlekken beïnvloedt meestal alle oogvlekken van een vlinder op een gelijke manier, hetgeen doet vermoeden dat de mogelijkheden voor evolutionaire veranderingen in vleugelpatronen gelimiteerd zijn. Omdat alle oogvlekken dezelfde onderliggende basis voor hun ontwikkeling delen, zou de mogelijkheid voor evolutionaire veranderingen van individuele oogvlekken in een verschillende richting beperkt kunnen zijn. Dat wil zeggen dat het gemakkelijker zou moeten zijn om gelijksoortige veranderingen van alle oogvlekken samen te krijgen (bijvoorbeeld allemaal groter of allemaal kleiner) en moeilijker om groepen van oogvlekken in tegengestelde richtingen te veranderen (bijvoorbeeld sommige groter en andere kleiner). In HOOFDSTUK 2 en 3 is het vermogen voor onafhankelijke veranderingen van twee verschillende oogvlekken getest door middel van kunstmatige selectie. Er bleek een grote flexibiliteit in de evolutie van vleugelpatronen te bestaan. Hieruit is geconcludeerd dat de ontwikkelingsmechanismen voor de vorming van oogvlekken de evolutionaire verandering in het patroon van relatieve grootte van oogvlekken bij *Bicyclus* niet beperken. Op basis van de genetische variatie binnen één enkele laboratoriumpopulatie van *B. anynana*, konden alle fenotypen verkregen worden uit het genus, en zelfs een fenotype dat bij geen enkele bekende soort binnen dit geslacht voorkomt (HOOFDSTUK 2). In HOOFDSTUK 3 wordt getoond dat de respons op selectie op de grootte van één bepaalde oogvlek maar beperkt afhankelijk is van het selectieregime dat is toegepast op een andere oogvlek. Deze flexibiliteit is waarschijnlijk het resultaat van een evolutionaire voorgeschiedenis die de onafhankelijkheid in ontwikkeling van de verschillende oogvlekken heeft bevoordeeld.

De in HOOFDSTUK 2 beschreven selectielijnen zijn vervolgens gebruikt om de verschillende aspecten van de processen, die de variatie in *B. anynana* veroorzaken, te verkennen. In HOOFDSTUK 4 wordt ingegaan op de genetische correlaties en organisatie van het gehele oogvlekpatroon, omdat eerder onderzoek aangaf dat dit patroon zich in de ontwikkeling (en evolutie) gedraagt als een eenheid. Er is

aangetoond dat er genetische correlaties bestaan tussen de grootte van oogvlekken op verschillende vleugels en verschillende vleugeldelen, ook zijn enkele (zwakkere) correlaties tussen oogvlek-grootte en andere kenmerken in de morfologie van oogvlekpatronen gevonden. De resultaten uit HOOFDSTUK 2 en 3 geven echter aan dat deze correlaties de evolutionaire mogelijkheden voor de vleugels van *B. anynana* niet beperken. HOOFDSTUK 5 behandelt de mogelijkheid dat dorsale oogvlekken een rol spelen bij de paarvorming en sexuele selectie in *B. anynana* en dat deze processen van invloed zijn op het in stand houden van de karakteristieke variatie in grootte van de oogvlekken. Er is onderzocht of er verschillen bestaan in de voorkeur van vrouwtjes voor mannetjes met verschillende combinaties van oogvlek-grootte. Zo'n voorkeur is niet gevonden maar in natuurlijke populatie zou dit anders kunnen zijn.

In HOOFDSTUK 6 en 7 wordt gebruik gemaakt van enerzijds de kennis over de moleculaire en cellulaire basis voor de vorming van oogvlekken en anderzijds de selectielijnen met oogvlekken van verschillende grootte, om het mechanisme achter de variatie in deze eigenschap te onderzoeken. HOOFDSTUK 6 behandelt het onderzoek naar de bijdrage van het gen *Distal-less* aan de variatie in oogvlek-grootte. Dit gen komt tot expressie in vleugelprimordia in rupsen en poppen, op plaatsen waarvan bekend is dat ze later de oogvlekken vormen. Er bleken kwantitatieve verschillen te zijn in de expressie van *Distal-less* tussen de selectielijnen met respectievelijk grote en kleine oogvlekken. Bij de kruisingen tussen deze selectielijnen zijn correlaties tussen polymorfismen in DNA-sequenties van het bewuste gen en de grootte van de oogvlekken gevonden. Deze gegevens suggereren dat moleculaire varianten van *Distal-less* hebben bijgedragen aan het resultaat van de kunstmatige selectie op oogvlek-grootte en mogelijk ook bijdragen aan de evolutie van vleugelpatronen bij verschillende soorten vlinders. Andere genen, die een rol kunnen hebben gespeeld in de respons op selectie worden bediscussieerd in HOOFDSTUK 7, in het bijzonder de verschillen in de expressie van het gen *engrailed* in relatie tot de oogvlek-grootte. Verder wordt ingegaan op het klonen van een homoloog van het gen *hedgehog*, een potentiële regulator van de expressie van het *engrailed* gen tijdens de vorming van de oogvlekken. Dit hoofdstuk geeft ook (zeer!) voorlopige resultaten van experimenten, die gericht zijn op verschillende eigenschappen van de cellulaire interacties, die ten grondslag liggen aan de vorming van oogvlekken. Er is onderzocht hoe deze eigenschappen onafhankelijke veranderingen kunnen voortbrengen in individuele oogvlekken op dezelfde kant van de vleugel. Verschillende componenten van dergelijke interacties hebben verschillend bijgedragen aan de veranderingen in de grootte van oogvlekken tussen de selectielijnen. Tenslotte behandelt HOOFDSTUK 7 de fenotypische karakterisering van een aantal mutantallelen, die een groot effect hebben op oogvlek-grootte. Dergelijke genen hebben mogelijk een rol gespeeld in het bevorderen van de onafhankelijkheid van de individuele oogvlekken op evolutionair- en ontwikkelingsniveau.

In het algemeen is er geen bewijs gevonden voor de sterke aanwezigheid van beperkingen voor het doen ontstaan van variatie in oogvlek-grootte in *Bicyclus anynana*, maar ook geen bewijs voor verschillen in fitness tussen sterk verschillende fenotypes. Onder natuurlijke omstandigheden kunnen echter andere typen van intra- of interspecifieke interacties of populatiedynamische beperkingen van invloed zijn op

het in stand houden van de relatieve oogvleksgrootte van *B. anynana* vlinders. Deze resultaten maken duidelijk dat voor het beter begrijpen van de variatie in de oogvleksgrootte rekening moet worden gehouden met de ecologische interacties van natuurlijke populaties van deze soort. De oogvlekken van *B. anynana* vlinders bieden een systeem waarmee morfologische variatie op een zeer geïntegreerde manier kan worden bestudeerd: van de ecologische relevantie ervan tot aan de moleculaire grondslag. Om de mogelijkheden van dit systeem voor onderzoek naar evolutie en ontwikkeling ten volle te benutten, moeten de verschillende niveau's waarop de vorming van oogvlekken is beschreven (zowel moleculair, cellulair, biochemisch als fysiologisch) nog wel bijeen worden gebracht in 'één compleet verhaal', tevens moet de ecologische relevantie ervan worden geanalyseerd. Welke van de ontwikkelingsmechanismen die in het laboratorium ontcijferd zijn, zijn daadwerkelijk relevant voor natuurlijke populaties? Welke fenotypische en genetische varianten vormen de basis voor de waargenomen verschillen in morfologie tussen soorten? Deze en dergelijke vragen zijn fundamenteel voor het kunnen begrijpen van evolutionaire processen die hebben geleid tot de verscheidenheid aan de kleur- en vormpatronen op vlinder-vleugels, die zowel biologen als niet-biologen al zo lang tot de verbeelding spreken.

SUMÁRIO

A diversidade de formas que encontramos nos organismos vivos resulta de um balanço entre os processos do desenvolvimento que, em cada geração, produzem diferentes formas e os processos evolutivos que, ao longo das gerações, fazem a triagem dessas variantes. Os padrões das asas das borboletas são um sistema ideal para um estudo integrado das interações entre evolução e desenvolvimento. Existe uma grande (e bastante espectacular!) diversidade nos padrões de cores e formas que decoram as asas das borboletas. Estes são muitas vezes importantes na comunicação visual com predadores ou parceiros sexuais e estão sob forte pressão da selecção natural. Por outro lado, a formação desses padrões durante o desenvolvimento das borboletas pode ser caracterizada a níveis diferentes, incluindo molecular, celular e fisiológico.

Bastantes estudos da evolução dos padrões das asas das borboletas e das interações entre variação genética e mecanismos do desenvolvimento centraram-se nos ocelos (aneis concêntricos de diferentes cores) de *Bicyclus anynana*. Esta borboleta tropical tem uma série de ocelos ao longo da margem das suas asas e bastante potencial para produzir variação nestes padrões (por exemplo, no número, forma e tamanho dos ocelos). No entanto, apesar de todas estas possibilidades, a variação genética para a morfologia dos ocelos geralmente afecta todos os ocelos na mesma borboleta numa forma concertada, sugerindo que a evolução dos padrões das asas possa estar limitada ou estrangida. Todos os ocelos partilham o mesmo mecanismo de desenvolvimento, e este acoplamento pode impedir ou dificultar as alterações evolutivas que afectam elementos individuais em direcções diferentes. Ou seja, é de esperar que seja mais fácil produzir alterações concertadas em todos os ocelos (por exemplo, tê-los todos maiores ou todos mais pequenos) e mais difícil alterar grupos de ocelos em direcções opostas (por exemplo, aumentar o tamanho