

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 constringida. 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

duns e diminuir o doutros). Nos CAPÍTULOS 2 e 3, usámos selecção artificial para testar o potencial para alterações independentes de dois ocelos na mesma asa, e descobrimos bastante flexibilidade na evolução deste padrão. Concluimos que as propriedades dos mecanismos de desenvolvimento que levam à formação dos ocelos provavelmente não limitam as alterações evolutivas do seu tamanho relativo. Com base na variação genética presente numa única população laboratorial de borboletas *B. anynana*, pudémos produzir todos os fenótipos que se encontram no género *Bicyclus*, e mesmo um que não é explorado em nenhuma das espécies de *Bicyclus* descritas (CAPÍTULO 2). No CAPÍTULO 3 verificámos que a resposta à selecção para alterar o tamanho de um ocelo particular depende pouco do regime selectivo imposto ao outro ocelo. Esta flexibilidade poderá ter resultado de uma história evolutiva que tenha favorecido a independência do desenvolvimento dos elementos individuais que compõem os padrões das asas das borboletas.

As linhas de borboletas com ocelos de tamanhos distintos (derivadas no CAPÍTULO 2) foram usadas para explorar diferentes aspectos dos processos que influenciam a variação nos padrões das asas de *B. anynana*. No CAPÍTULO 4 estudámos as correlacções genéticas dentro do padrão composto por todos os ocelos, já que estudos prévios tinham sugerido que este padrão, em vez dos ocelos individuais, deveria ser considerado uma unidade de desenvolvimento (e evolução) única. Descrevemos correlacções genéticas para o tamanho de ocelos em asas e superfícies alares diferentes e também algumas correlacções (mais fracas) entre o tamanho dos ocelos e outras características da morfologia dos ocelos. No entanto, os resultados descritos nos CAPÍTULOS 2 e 3 sugerem que estas correlacções provavelmente não limitam as “opções evolutivas” dos padrões das asas das borboletas *B. anynana*. No CAPÍTULO 5 explorámos a possibilidade de que diferenças no tamanho dos ocelos pudessem ser importantes nos processos de corte e selecção sexual, e que estes processos pudessem estar envolvidos na manutenção do padrão de tamanho relativo dos ocelos da borboleta *B. anynana*. Testámos a preferência de fêmeas da população-base (*i.e.* sem selecção artificial para o tamanho dos ocelos) para acasalar com machos com diferentes fenótipos e não encontrámos evidência de quaisquer diferenças entre machos com ocelos de diferentes tamanhos. No entanto, a situação na natureza pode ser bastante diferente.

Nos CAPÍTULOS 6 e 7 usámos os conhecimentos sobre as componentes molecular e celular da formação dos ocelos, e as nossas linhas seleccionadas com ocelos de tamanhos diferentes para caracterizar a base mecanística da variação nestes elementos. O CAPÍTULO 6 relata o estudo da contribuição do gene candidato *Distal-less* para variação no tamanho dos ocelos de *B. anynana*. Era sabido que este gene era expresso em associação com os centros celulares que induzem a formação dos ocelos nos primórdios das asas das borboletas. Nós descobrimos que havia diferenças quantitativas nesta expressão em borboletas de linhas fenotipicamente diferentes (isto é, borboletas com ocelos grandes tinham maiores áreas de expressão de *Distal-less* do que borboletas com ocelos pequenos). Para além do mais, encontrámos também evidência para a associação entre polimorfismos na sequência nucleotídica de *Distal-less* e o tamanho dos ocelos, em borboletas produzidas por cruzamentos envolvendo aquelas linhas. Estes resultados sugerem que variantes

moleculares do gene *Distal-less* contribuíram para a resposta à selecção artificial no tamanho dos ocelos de *B. anynana* e poderão também contribuir para a evolução dos padrões das asas entre espécies diferentes. Outros genes candidatos que poderão ter estado envolvidos na resposta à selecção artificial são discutidos no CAPÍTULO 7. Em particular, mostrámos que há diferenças quantitativas na expressão do gene *engrailed* associadas a diferenças no tamanho dos ocelos e clonámos um homólogo do gene *hedgehog* em *B. anynana*, um potencial regulador da expressão de *engrailed* durante a formação dos ocelos. Neste capítulo também discutimos resultados (muito!) preliminares de experiências feitas para examinar a forma como as propriedades das interacções celulares subjacentes à formação dos ocelos podem ser alteradas para produzir alterações independentes em diferentes ocelos na mesma asa. Os nossos resultados mostram que diferentes componentes destas interacções parecem ter contribuído de forma distinta para as alterações do tamanho dos ocelos em diferentes linhas de selecção. Finalmente, fizémos ainda a caracterização do efeito de três “alelos mutantes” que afectam o tamanho dos ocelos, e discutimos que genes deste tipo poderão ter sido importantes para promover a independência no desenvolvimento e evolução de ocelos individuais.

Na globalidade, não encontrámos provas para a acção de constrangimentos à produção de variação no tamanho dos ocelos das borboletas *B. anynana*, mas também não encontrámos provas de diferenças de *fitness* entre linhas de borboletas com fenótipos diferentes. No entanto, na natureza, outros tipos de interacções intra- ou inter-específicas ou limitações impostas pela estrutura populacional podem estar envolvidos em manter o tamanho relativo dos ocelos destas borboletas. Para compreendermos os padrões de variação no tamanho dos ocelos nas borboletas *B. anynana* teremos de ter em consideração as interacções ecológicas que ocorrem em populações naturais desta espécie. Os ocelos das borboletas *B. anynana* proporcionam um sistema onde a variação morfológica pode ser estudada duma forma altamente integrada, indo desde estudos da sua relevância ecológica até à identificação das moléculas envolvidas na produção desta variação. Para aproveitar em pleno o potencial deste sistema para estudos de evolução e desenvolvimento, os diferentes níveis aos quais a formação dos ocelos tem sido caracterizada (incluindo molecular, celular, bioquímico e fisiológico) terão de ser integrados numa “história completa” e o seu valor ecológico analisado. Que aspectos da variação nos mecanismos de desenvolvimento estudados no laboratório são relevantes na natureza? Que variantes fenotípicas e genéticas são a base de diferenças entre espécies? Estas e outras questões relacionadas serão de fundamental importância para compreender a diversificação evolutiva que produziu a enorme variedade nos padrões de cores das asas das borboletas, que desde há tanto impressiona biólogos e não biólogos.