

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Genética
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Síndromes florais: contribuição da diversidade genética, polimorfismos fenotípicos e hibridação nos padrões de transição

Aléxia Gonçalves Pereira

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Loreta Brandão de Freitas

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Porto Alegre
Fevereiro de 2024

Instituições e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução Molecular e no Núcleo de Genômica Funcional de Plantas do Departamento de Genética, e no Laboratório de Genomas e populações de Plantas do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Também foi utilizada a casa de vegetação do Departamento de Genética e a câmara de crescimento de plantas do Laboratório de Evolução, Ecologia Química e Quimiotaxonomia do Departamento de Botânica da UFRGS.

O trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM). A bolsa de doutorado foi concedida pela CAPES.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me guiar até aqui. A Ele toda a honra e toda a glória.

Agradeço a CAPES pela bolsa de doutorado e pela extensão de prazo devido à pandemia.

Agradeço ao PPGBM pela oportunidade, a UFRGS e ao LEM pela estrutura e apoio necessário durante esses anos de doutorado. Aos laboratórios de Genética Vegetal, Química Analítica, Citogenética, Laboratório de Evolução, Ecologia Química e Quimiotaxonomia (LEEQTAX) e Laboratório de Genômica e População de Plantas pelo apoio logístico em diversas análises.

A Loreta Brandão de Freitas pela orientação e oportunidade de trabalhar com as *Petunias* e conhecer uma nova área de trabalho tão interessante.

Ao Elmo e ao Gabriel por toda assistência e ajuda durante esses anos de doutorado.

A todos os amigos e colegas que fiz durante esses anos, sem vocês os dias comuns não teriam sido tão extraordinários.

A minha família que mesmo tão longe nunca me deixou sentir distante.

Ao meu noivo Fábio, que se mudou de estado para me apoiar durante todos esses anos. Obrigada por estar sempre comigo.

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Introdução Geral	7
Objetivos	15
Apresentação da tese	16
Capítulo 1:	17
Artigo “Phylogenetic analyses of some key genes provide information on pollinator attraction in Solanaceae”	
Capítulo 2:	34
Artigo “Can regulatory elements explain differences in <i>Petunia</i> floral syndromes?”	
Capítulo 3:	75
Artigo “Tracing the flower puzzle: Hybridization insights into <i>Petunia</i> pollination strategies”	
Capítulo 4:	123
Artigo “Comparing gene expression in canonical and interspecific hybrid individuals of <i>Petunia</i> with contrasting floral syndromes”	
Capítulo 5:	154
Artigo “Machine learning to infer trait-matching and predict floral syndromes in interspecific hybrids”	
Considerações Finais	179
Bibliografia - Introdução Geral e Considerações Finais	181

Resumo

A diversidade de traços florais atrai diferentes grupos de polinizadores. Essa premissa embasa a teoria das síndromes de polinização. No gênero *Petunia*, as diferentes síndromes de polinização estão relacionadas à rápida diversificação das espécies do gênero, tornando-o um potencial modelo para estudos sobre as respostas genéticas e morfológicas das trocas de polinizadores. Nessa tese o objetivo central foi descrever os processos de especiação no gênero *Petunia* através da caracterização das síndromes florais em híbridos interespecíficos de primeira geração entre as espécies *Petunia axillaris*, *P. exserta* e *P. secreta* que apresentam síndromes florais distintas. Para atingir nossos objetivos utilizamos diversas metodologias para avaliar diferentes traços florais atrativos aos polinizadores. Nos capítulos 1 e 2 realizamos análises in silico utilizando sequências genômicas de genes relacionados à determinação da cor visível, resposta sob luz ultravioleta, produção de aroma e néctar. A comparação filogenética de múltiplas espécies da família Solanaceae recuperou as relações filogenéticas das espécies dentro de cada gênero. A análise das regiões regulatórias demonstrou forte atuação do componente filogenético na distinção dos *cis*-elementos entre os clados de tubo longo e tubo curto de *Petunia*. No capítulo 3, analisamos os traços florais dos híbridos F1 e das espécies canônicas mediante medições, morfologia, análise de coloração, resposta à luz UV, caracterização do néctar, contagem de pólen e receptividade estigmática. Chegamos a síndromes diferentes para os híbridos envolvendo *P. axillaris* e os híbridos entre *P. exserta* e *P. secreta*. No capítulo 4, analisamos a expressão dos genes relacionados aos fenótipos atrativos tanto nos híbridos quanto nas espécies canônicas e concluímos que a presença de polimorfismos naturais nos indivíduos parentais promoveu elevada variabilidade na expressão dos genes dificultando a associação aos fenótipos. No capítulo 5, realizamos análises in silico de aprendizado de máquina e árvores de decisão a partir de dados fenotípicos. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados no capítulo 3, comprovando a utilidade das análises in silico para a identificação das síndromes florais, nortando novos experimentos na natureza. Em conjunto, nossos dados mostraram a complexidade da interação planta-polinizador sobre os processos de especiação no gênero *Petunia*, destacando a importância da investigação interdisciplinar para elucidar os mecanismos de evolução das síndromes florais.

Abstract

The diversity of floral traits attracts different groups of pollinators. This premise supports the pollination syndromes theory. In the genus *Petunia*, the different pollination syndromes are related to the rapid species diversification, making the genus a potential model for studies on the genetic and morphological responses to pollinator shifts. In this thesis, the main objective was to describe the speciation processes in the genus *Petunia* through the characterization of floral syndromes in first-generation interspecific hybrids between the species *Petunia axillaris*, *P. exserta*, and *P. secreta*, which present distinct floral syndromes. To achieve our objectives, we use different methodologies to evaluate floral traits attractive to pollinators. In Chapters 1 and 2, we performed in silico analyses using genomic sequences of genes related to the determination of visible color, response to ultraviolet light, aroma, and nectar production. Phylogenetic comparisons in the Solanaceae family recovered the phylogenetic relationships of species within each genus. The analysis of regulatory regions demonstrated the phylogenetic component's crucial role in distinguishing the cis-elements between the long-tube and short-tube clades of *Petunia*. In Chapter 3, we analyzed the floral traits of F1 hybrids and canonical species through morphology measurements, color analysis, response to UV light, nectar characterization, pollen amount, and stigmatic receptivity. We observed different floral syndromes for hybrids following the parental species. In Chapter 4, we analyzed the expression of genes related to attractive phenotypes in both hybrids and canonical species and concluded that the presence of natural polymorphisms in parental individuals promoted high variability in gene expression, making association with phenotypes difficult. In Chapter 5, we perform in silico machine learning and decision tree analysis from phenotypic data. The results obtained were similar to those found in Chapter 3, proving the usefulness of in silico analyses for identifying floral syndromes, guiding new experiments in nature. Taken together, our data showed the complexity of plant-pollinator interactions on speciation processes in the genus *Petunia*, highlighting the importance of interdisciplinary research to elucidate the mechanisms of evolution of floral syndromes.

Introdução Geral

Síndrome de polinização: do gene ao fenótipo e efeitos da atração

As flores desempenham um papel fundamental na comunicação entre plantas e animais polinizadores nas Angiospermas. A diversidade de características florais reflete uma adaptação complexa guiada por agentes polinizadores, antagonistas florais e fatores abióticos (Strauss and Whittall, 2006; Harder and Johnson, 2009; van der Niet *et al.*, 2014; Gervasi and Schiestl, 2017; Campbell *et al.*, 2018; Caruso *et al.*, 2018; Dellinger, 2020).

Para garantir a polinização bem-sucedida, as plantas utilizam uma variedade de sinais florais, como morfologia, cor visível, resposta a luz UV, aroma e tamanho da flor para atrair e guiar os polinizadores. Como recompensa pelo gasto energético, néctar, pólen, óleo ou resina são oferecidos aos polinizadores (Wester and Lunau 2017). Cada conjunto de traços florais atrai diferentes grupos de polinizadores com base em seus atributos sensoriais, preferências alimentares, comportamento, morfologia e atividade (Fenster *et al.*, 2004; Dellinger, 2020), fenômeno conhecido como síndrome de polinização. Esta teoria postula que as flores se adaptam ao seu grupo de polinizadores funcionais mais eficientes que selecionam a combinação de traços florais mais atrativa e recompensadora (Fenster *et al.*, 2004). Atualmente são reconhecidos 11 grupos funcionais: abelhas, pássaros, morcegos, moscas, vespas, mariposas, borboletas, moscas de língua longa, besouros, moscas varejeiras e mamíferos não voadores (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014; Ashworth *et al.*, 2015; Dellinger, 2020).

O conjunto de traços florais que atraem mariposas noturnas são: flores cuja corola absorvam luz no comprimento de onda de UV (que a destaca contra as folhagens durante a noite), coloração branca ou pastel, tubo longo que abriga néctar volumoso e pouco concentrado, emissão de aromas doces e fortes durante a noite que facilitam a localização pelas mariposas a longas distâncias (Faegri and Pijl 1979; Willmer, 2011; Neto, 2013; Sheehan *et al.*, 2016; Albuquerque-Lima *et al.*, 2020). Para polinizadores diurnos como beija-flores e abelhas as flores mais atraentes possuem cores vibrantes e corolas reflexivas à UV. Além disso, beija-flores preferem flores tubulares, sem aroma, com néctar volumoso e pouco viscoso, cujas cores normalmente variam de vermelho a laranja (Castellanos *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2007), enquanto abelhas visitam flores de tons de amarelo, rosa, violeta, padrões UV formando guias de néctar e odor doce com néctar viscoso e pouco volumoso (Prance, 1985).

Claramente, a previsibilidade das síndromes de polinização é maior em espécies dependentes de polinizadores. Portanto, plantas dioicas, monoicas e hermafroditas autoincompatíveis polinizadas por animais estão sujeitas à seleção mais consistente de características florais do que espécies autocompatíveis (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). A distribuição geográfica também influencia a relação entre plantas e polinizadores. Espécies cuja polinização está relacionada a todos os tipos de moscas, vespas e mamíferos não voadores são encontradas principalmente em regiões extratropicais, enquanto espécies de plantas quiropterófilas (polinizadas por morcegos) são quase exclusivas de regiões tropicais (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). Além disso, as síndromes de polinização que ocorrem em diferentes partes do mundo como as dependentes de morcegos e pássaros apresentam diferentes combinações de características (Fleming *et al.*, 2009; Dellinger, 2020). Por exemplo, a cor vermelha de flores polinizadas por pássaros e abelhas, que têm mudanças na reflectância que afeta a maneira como a flor é vista pelos polinizadores no Velho Mundo e no Novo Mundo. Isso faz com que as flores do Novo Mundo sejam mais especializadas para a visão de beija-flores e pássaros, tornando-se “invisíveis” para as abelhas (Chen *et al.*, 2020).

De fato, a maioria das flores é visitada por vários grupos funcionais de polinizadores (por exemplo, Waser *et al.*, 1996; Ollerton *et al.*, 2007). Durante a busca por alimento, os polinizadores tendem a explorar flores, mesmo aquelas que não atendem suas preferências, durante o processo de forrageamento. Quando um animal visita uma flor e transfere uma grande quantidade de pólen, é considerado o polinizador eficaz da espécie (Fenster *et al.*, 2004). Quando a transferência de pólen é limitada, esses animais são conhecidos como polinizadores secundários (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). No entanto, também existem visitantes antagonistas, que são atraídos para a flor pelos mesmos atributos que os polinizadores, mas atuam como florívoros e ladrões de néctar, não contribuindo para a polinização, mas exercendo pressão sobre o estabelecimento dos traços florais (Bartkowska and Johnston 2012; Gélvez-Zúñiga *et al.* 2018).

Os polinizadores secundários das plantas pertencem a grupos de polinizadores que se originaram mais cedo na história evolutiva do que o grupo de polinizadores primários previsto pela síndrome. Algumas das transições mais comuns em sistemas de polinização de abelha para mariposa, de abelha para pássaro e de pássaro para morcego (van der Niet and Johnson, 2012). Isso implica uma troca de síndrome de polinização ao longo da evolução das angiospermas. Portanto, traços florais têm o potencial de se

adaptar mediante novas condições de polinização seletiva (Kay *et al.*, 2005; Whittall and Hodges, 2007; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014).

Petunia Juss. é um gênero da família Solanaceae com uma história de diversificação recente (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Särkinen *et al.*, 2013), relacionada a diferentes síndromes de polinização e isolamento geográfico (Fregonezi *et al.*, 2013), sendo um gênero endêmico da América do Sul (Stehmann *et al.*, 2009). O comprimento do tubo da corola delimita dois grupos de espécies nesse gênero (Reck-Kortmann *et al.*, 2014). As espécies do clado de tubo curto são roxas e polinizadas por abelhas coletoras de néctar e pólen, enquanto as espécies de tubo longo têm corola de cores variadas e síndromes de polinização diferentes (Reck-Kortmann *et al.*, 2014). O segundo grupo é composto por três espécies, *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb., *P. exserta* Stehmann e *P. secreta* Stehmann & Semir e a espécie *P. occidentalis* R.E. Fr. (endêmica da região subandina na Argentina e cujas características morfológicas a aproximam das espécies de tubo curto) (Reck-Kortmann *et al.*, 2014).

Petunia axillaris é descrita como polinizada por mariposas noturnas, sendo a espécie *Manduca sexta* sua polinizadora efetiva (Ando *et al.*, 1995; Venail *et al.*, 2010; Klahre *et al.*, 2011), embora existam relatos de vespas e abelhas como visitantes florais relativamente frequentes (Ando, 2001; Hoballah *et al.*, 2007). A corola é branca e absorve a luz ultravioleta (Sheehan *et al.*, 2016). As flores produzem forte aroma ao anoitecer (Oyama-Okubo *et al.*, 2005; Klahre *et al.*, 2011) e têm grande volume de néctar quando comparado com as espécies polinizadas por abelhas (Stuurman *et al.*, 2004; Galliot *et al.*, 2006). *Petunia secreta* é uma espécie que divergiu recentemente a partir de *P. axillaris* (Reck-Kortmann *et al.*, 2014). Como características apresenta a flor com corola rosa e não-perfumada (Stehmann and Semir, 2005), que reflete luz UV (Rodrigues *et al.* 2018); o néctar produzido tem volume e concentração de açúcar menores que os observados em *P. axillaris* (Gleiser *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2018). Essa espécie é polinizada por abelhas solitárias do gênero *Pseudagapostemun*, embora o conjunto de traços florais seja atrativo também a outros visitantes florais com potencial de polinizadores como beija-flores (Rodrigues *et al.*, 2018). *Petunia exserta* é a espécie do gênero de corola vermelha e reflexiva à luz UV (Esfeld *et al.* 2018), com estames e estigmas excertos (Stehmann, 1987; Lorenz-Lemke *et al.*, 2006), grandes quantidades de néctar e que não produz aromas florais (Stehmann, 1987; Stehmann *et al.*, 2009; Segatto *et al.*, 2014). Esses atributos correspondem a flores polinizadas por beija-flores,

os quais já foram documentados visitando as flores de *P. exserta* na natureza e em cultivo.

Alterações nas características florais de *Petunia* têm sido associadas a mudanças na síndrome floral. Cor e aroma floral são características bastante estudadas, o que torna *Petunia* um organismo modelo para estudos da genética e evolução das síndromes de polinização (Gubitz *et al.*, 2008; Vandenbussche *et al.*, 2016).

A cor visível da corola e a resposta à luz UV são dadas por metabólitos secundários da classe dos flavonoides e incluem antocianinas e flavonóis (Winkel-Shirley, 2001). Os últimos substratos comuns entre antocianinas e flavonóis são diidroflavonóis. A ação da enzima flavonol sintase (FLS) produz flavonóis, enquanto a diidroflavonol-4-redutase (DFR) produz antocianinas em cores laranja-vermelho, magenta ou azul (Winkel, 2006). Fatores de transcrição que ativam a produção de flavonóis e antocianinas são responsáveis pelo equilíbrio dos caminhos e acumulação de metabólitos.

A cor branca em *P. axillaris* ocorre devido à ausência de antocianina promovida pela inativação do fator de transcrição AN2, que ativa os genes biossintéticos DFR e de antocianina “downstream” (Quattrocchio *et al.*, 1999). A cor roxa retorna à corola de *P. secreta* devido à ressurreição de AN2 por uma mutação restauradora de um único quadro de leitura (Esfeld *et al.*, 2018). A cor vermelha de *P. exserta* é mais complexa, pois o gene DFR não reconhece diidrocaempferol, o intermediário que dá origem à antocianina vermelha (pelargonidina) (Johnson *et al.*, 2001) e o gene AN2 não é funcional. No entanto, o parálogo do AN2, DEEP PURPLE (DPL), restaura a biossíntese de antocianinas que, juntamente com outros genes, cria a cor vermelha a partir do equilíbrio entre cianidina e delphinidina (Berardi *et al.*, 2021).

O MYB-FL é um fator de transcrição que ativa FLS e genes biossintéticos de flavonol a jusante (Sheehan *et al.*, 2016). Este único gene pode influenciar as diferenças nos níveis de flavonol e, conseqüentemente, a resposta à luz UV em espécies de *Petunia*. A regulação positiva de MYB-FL determina o acúmulo de flavonol e características de absorção de UV em *P. axillaris*. A regulação negativa em *P. secreta* e a inativação em *P. exserta* determinam o traço de corola refletora de UV, já que o gene é não funcional e o acúmulo de flavonoides é prejudicado (Sheehan *et al.*, 2016; Esfeld *et al.*, 2018). A diferença na expressão de MYB-FL entre *P. axillaris* e *P. secreta* foi associada a uma mutação cis-regulatória (Esfred *et al.*, 2018).

A emissão de aromas pela ativação dos voláteis florais benzenoides/fenilpropanoides (do inglês, FVBP) é uma característica-chave para atrair mariposas noturnas em *P. axillaris* (Amrad *et al.*, 2016). Existe uma maquinaria regulatória da emissão de voláteis por fatores de transcrição. O gene *Odorant 1* é o principal ativador da via, ligando-se ativamente a vários genes (Verdonk *et al.*, 2005; Boersma *et al.*, 2022). Os genes *Emission of Benzenoid I* e *II* (EOBI e EOBII) ativam conjuntamente a transcrição do gene ODO1 durante a noite e o *Late Elongated Hypocotyl* (LHY) inativa a expressão de ODO1 durante o dia (Colquhoun *et al.*, 2011; Spitzer-Rimon *et al.*, 2010, 2012; Fenske *et al.*, 2015; Chopy *et al.*, 2023). Portanto, o pico de emissão de voláteis coincide com o horário de forrageamento máximo da mariposa *Manduca sexta* à noite (Fenske *et al.*, 2015).

A perda de aromas florais em *P. exserta* durante a transição para a polinização por beija-flores deve-se à redução na expressão do gene ODO1 e à inativação do gene *Cinnamate:CoA Ligase* (CNL), um gene intermediário (Amrad *et al.*, 2016). Relata-se que as flores de *P. secreta* são inodoras (Stehmann and Semir, 2005), mas os voláteis emitidos pelo pólen são atrativos para abelhas (Rodrigues *et al.*, 2018). Em *P. inflata*, uma espécie de tubo curto polinizada por abelhas, a biossíntese volátil é bloqueada pela inativação de genes de final de via, como a *Benzoyl-CoA:Benzyalcohol/2-Phenylethanol Benzoyltransferase* (BPBT) e a *S-Adenosyl-1-Methionine:Benzoic Acid/Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase* (BSMT) (Amrad *et al.*, 2016).

O gênero *Petunia* oferece dois tipos de recompensas florais, néctar e pólen. A atratividade do néctar depende não apenas da quantidade de néctar produzida, mas também da concentração de açúcar e da composição química (Vandelook *et al.*, 2019). O açúcar que faz parte do néctar pode ser derivado do floema por translocação ou originar-se da hidrólise do amido acumulado nos nectários (Pacini and Nepi, 2007; Heil, 2011). A proteína *Nectary 1* (NEC1), identificada como SWEET9 em outros trabalhos, funciona como um transportador de açúcar específico do néctar e é crucial para a produção de néctar, influenciando a concentração e a viscosidade do néctar (Lin *et al.*, 2014).

As espécies de *Petunia* não apresentam barreiras reprodutivas de pós-polinização exibindo diferentes síndromes de polinização como uma barreira pré-zigótica. Por isso, *Petunia* é um modelo interessante para investigar a divergência

impulsionada pelos polinizadores e de como as principais características florais afetam o comportamento dos polinizadores.

Hibridação em *Petunia*

A hibridação sempre foi reconhecida como um processo significativo na diversificação das plantas e pode ocorrer em uma região contínua de simpatria das espécies (Milne *et al.*, 1999) ou em zonas de contato secundário entre as espécies parentais (Abbott, 2017). Em *Petunia*, a hibridação entre *P. axillaris*, do clado de tubo longo, e *P. integrifolia* (Stehmann *et al.*, 2009), *P. interior* (Segatto *et al.*, 2014) ou *P. inflata* (Bombarely *et al.*, 2016), todas do clado de tubo curto, deu origem às diversas variedades comerciais de *P. hybrida* que estão presentes em diferentes países. Adicionalmente, a hibridação interespecífica natural tem sido relatada entre diferentes espécies do gênero (Lorenz-Lemke *et al.* 2006; Giudicelli *et al.* 2019; Pezzi *et al.*, 2022).

Petunia axillaris é amplamente encontrada nos campos do Pampa no Brasil (Rio Grande do Sul), Argentina e Uruguai, e em campos do Paraguai e Bolívia (Ando *et al.*, 2001). Em várias localidades, a distribuição de *P. axillaris* se sobrepõe com a de outras espécies do gênero, como *P. exserta*. *Petunia exserta* é endêmica da localidade denominada Guaritas, uma formação rochosa na Serra do Sudeste, no sul do Brasil. Embora cresçam em simpatria, *P. exserta* e *P. axillaris* estão parcialmente isoladas em micro-habitats adjacentes, enquanto as plantas de *P. exserta* crescem apenas dentro dos abrigos (fendas sombreadas) das torres de arenito, onde estão protegidas da chuva direta e da luz solar, os indivíduos de *P. axillaris* crescem em habitats abertos e ensolarados (Turchetto *et al.*, 2015). A aproximadamente 30 km das Guaritas, na Pedra do Segredo ocorre a *Petunia secreta*, outra espécie endêmica, que cresce em áreas abertas em torres de arenito (Turchetto *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2018).

Na região onde *P. axillaris* e *P. exserta* co-ocorrem, plantas com flores com características morfológicas intermediárias entre os tipos canônicos dessas espécies têm sido encontradas todos os anos desde 2002, compartilhando o mesmo micro-habitat com *P. exserta*. A cor atípica da flor, variando de rosa escuro a levemente rosado, é o principal traço distintivo para os indivíduos intermediários (Teixeira *et al.*, 2019). Alguns trabalhos baseados em marcadores moleculares e morfologia sugeriram hibridização interespecífica, e com base na germinabilidade e no desenvolvimento de plantas com indivíduos de cor intermediária, estas são férteis e viáveis (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Turchetto *et al.* 2015; 2019; Teixeira *et al.*, 2020). Esta nova linhagem

aumentou ao longo de mais de duas décadas de observações, mostrando estabilidade populacional com híbridos de segunda geração e retrocruzamentos e tem sido associada à introgressão nas espécies parentais (Teixeira *et al.*, 2020; Schnitzler *et al.*, 2020; Caballero-Villalobos *et al.*, 2021; Pezzi *et al.*, 2022).

Recentemente, uma nova população na Serra do Sudeste, próxima à rodovia BR-290, exibiu uma intrigante variação na cor das flores, que variava de roxo claro a escuro, sugerindo tratar-se de uma hibridação entre uma espécie com corola branca e outra com flores roxas (Pezzi *et al.*, em preparação). Também há relatos de indivíduos com características morfológicas intermediárias entre *P. exserta* e *P. secreta* na Pedra do Segredo, dos quais há poucas informações (Backes *et al.*, 2024).

A hibridação é mais provável de ocorrer em populações autocompatíveis, como é o caso de *P. secreta* (Stehmann and Semir, 2005), *P. exserta* testado em estufa, dados não publicados) e *P. axillaris* (quando em simpatria com outras espécies; Kokubun *et al.*, 1997). Embora diferentes síndromes de polinização atuem como uma barreira pré-zigótica (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; Fregonezi *et al.*, 2013; Segatto *et al.*, 2014; Hermann *et al.*, 2015; Amrad *et al.*, 2016; Esfeld *et al.*, 2018), existem relatos de visitação de abelhas coletoras de pólen e beija-flores em *P. axillaris* (estes últimos em populações do Uruguai), e borboletas em *P. secreta*. Além disso, na Pedra do Segredo, onde ocorre *P. secreta*, é relatado a presença de grandes populações mariposas noturnas, e na região das Guaritas as populações de *P. exserta* são pequenas e espaçadas, o que pode influenciar os beija-flores a buscar recursos além das flores ornitófilas.

Indivíduos híbridos podem atrair os mesmos polinizadores que seus parentais repetindo as síndromes de polinização, e adotando alguma barreira pré- ou pós-zigótica, ou atrair novos polinizadores alterando a dinâmica de interação com os visitantes florais já existentes. Para híbridos homoploides, mecanismo que gera novas espécies e aumenta a biodiversidade sem qualquer alteração no número de cromossômico (Abbott *et al.* 2013), como em *Petunia*, a atração de uma nova guilda de polinizadores favorece a especiação (Marques *et al.*, 2016) por estabelecer barreiras pré-zigóticas. Entretanto, pouco se sabe sobre os prováveis polinizadores e mantenedores das populações híbridas naturais entre as espécies *P. axillaris*, *P. secreta* e *P. exserta*.

Diferentes estratégias são utilizadas para estabelecer e validar o polinizador efetivo de uma espécie. As mais clássicas envolvem observações a campo, estabelecendo frequência de visitação, remoção de pólen e deposição destes nos estigmas, identificação e quantificação de pólen no corpo dos polinizadores e aplicação

das síndromes florais (Stehmann and Semir, 2001; Dafni *et al.*, 2005; Solís-Montero and Vallejo-Marín, 2017). Durante os anos de monitoramento das populações híbridas, poucas visitas de polinizadores foram registradas. Além disso, as espécies de *Petunia* de tubo longo tem pólen amarelo com poucas ou nenhuma diferença estrutural entre elas (Stehmann, 1999), o que dificulta a distinção das espécies baseado no pólen. Uma vez que o fenótipo é resultado da interação entre a expressão dos genes e o ambiente, entende-se que as modificações dos fenótipos atrativos aos polinizadores encontrados nas espécies de *Petunia* têm bases genéticas. Alguns genes são apontados como chave nas transições de síndromes de polinização por promoverem modificações nos traços morfológicos. Todo o processo, desde a sequência genética, passando pela regulação genética até a expressão do fenótipo, é complexo e envolve muitas variáveis. Por esses motivos aplicamos diferentes metodologias, desde a genética até a morfologia, para investigar as síndromes de polinização dos híbridos interespecíficos F1 entre *P. axillaris*, *P. secreta* e *P. exserta*. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação a fim de maximizar a homogeneidade nas análises.

Objetivos

Contribuir para o entendimento dos processos de especiação no gênero *Petunia* através da caracterização das síndromes florais das espécies *Petunia axillaris*, *P. exserta* e *P. secreta* e seus híbridos de geração F1.

Objetivos específicos:

1. Verificar se genes relacionados à atração de polinizadores são conservados entre as espécies de Solanaceae devido à convergência ou se a história evolutiva reflete a ancestralidade comum de cada gênero.
2. Encontrar pistas que expliquem a ocorrência de síndromes florais divergentes entre espécies que conservam sequências de codificação ou que indiquem adaptação convergente a um determinado tipo de polinizador.
3. Investigar as características morfológicas dos híbridos entre espécies de *Petunia* que ocorrem na mesma área geográfica e que hibridam naturalmente.
4. Analisar a expressão gênica nas espécies canônicas de *Petunia* e os seus híbridos F1 interespecíficos e identificar a correlação entre a expressão de genes e o fenótipo observado nos híbridos.
5. Inferir o polinizador mais plausível para os híbridos F1 entre espécies de *Petunia* utilizando modelagem in silico da combinação entre fenótipo observado e a hipótese de correspondência de traços inerente ao conceito de síndrome de polinização.

Apresentação da tese

A presente tese está dividida em cinco capítulos de forma a abordar os objetivos estabelecidos no projeto.

Os capítulos 1 e 2 envolvem análises *in silico* a partir de sequências genômicas de genes cruciais no estabelecimento de fenótipos atrativos e recompensadores para polinizadores. No capítulo 1, analisamos as sequências de quatro genes das rotas de produção de pigmentos responsáveis pela cor visível e resposta sob luz ultravioleta, produção de aroma e néctar em espécies da família Solanaceae com diferentes síndromes florais. A comparação das múltiplas espécies tentou identificar sequências e motivos proteicos convergentes entre espécies que compartilham os mesmos fenótipos e, por outro lado, identificar aqueles que possam explicar as transições entre polinizadores nestas espécies.

No capítulo 2, partimos para uma análise detalhada das regiões regulatórias dos mesmos genes estudados no capítulo 1, adicionando mais dois importantes genes na biossíntese de aromas, agora apenas comparando as quatro espécies do gênero *Petunia* que tem seus genomas sequenciados. Duas destas espécies compartilham o mesmo grupo funcional de polinizadores, enquanto que as outras duas tem síndromes florais diversas. Novamente partimos da premissa de convergência entre espécies com fenótipos compartilhados e buscamos por divergências regulatórias para explicar a transição entre polinizadores.

No capítulo 3, realizamos cruzamentos interespecíficos e medimos os diferentes aspectos que constituem as síndromes florais, comparando híbridos e parentais canônicos em ambientes controlados.

No capítulo 4, analisamos a expressão dos genes estudados nos capítulos 1 e 2 nos híbridos caracterizados no capítulo 3 e seus parentais usando como ferramenta análises de qRT-PCR na tentativa de identificar o impacto de tais genes no fenótipo dos híbridos.

Por fim, no capítulo 5, realizamos análises *in silico* integrando os resultados do capítulo 3 em uma abordagem de aprendizado de máquina com três modelos de combinação de traços. Este capítulo visou inferir, a partir do conhecimento das síndromes florais dos parentais, quais os polinizadores mais prováveis dos híbridos interespecíficos.

Capítulo 1

Phylogenetic analyses of some key genes provide information on pollinator attraction in Solanaceae

Aléxia G. Pereira, Sebastián Guzmán-Rodríguez, Loreta B. Freitas


Artigo publicado no periódico *Genes*

Resumo

As síndromes florais são conhecidas pelas características morfológicas conservadas nas flores associadas com atração de polinizadores, como formato e cor da corola, emissão e composição de aroma, e recompensas, principalmente o volume de néctar e a concentração de açúcar. Aqui, empregamos uma abordagem filogenética para investigar sequências de genes envolvidos nas vias biossintéticas responsáveis por alguns fenótipos atrativos para polinizadores usando genomas de espécies da família Solanaceae. Incluímos genes envolvidos na determinação da cor visível, resposta à luz UV, emissão de aroma e produção de néctar para testar a hipótese de que esses genes essenciais evoluíram por convergência sob a seleção de polinizadores. Nossos resultados refutaram esta hipótese, pois todos os genes estudados recuperaram as relações filogenéticas das espécies em cada gênero, embora alguns sítios tenham sido selecionados positivamente. Encontramos diferenças nos motivos proteicos entre os gêneros estudados de Solanaceae que não estavam necessariamente associadas a mesma síndrome floral. Embora tenham um papel crucial na diversificação das plantas, a interação planta-polinizador é complexa e ainda precisa investigações mais aprofundadas, incluindo genes evoluindo não apenas sob a influência de polinizadores, mas pela soma de diversas forças evolutivas ao longo do processo de especiação em Solanaceae.

Article

Phylogenetic Analyses of Some Key Genes Provide Information on Pollinator Attraction in Solanaceae

Aléxia G. Pereira, Sebastián Guzmán-Rodríguez and Loreta B. Freitas * 

Laboratory of Molecular Evolution, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil

* Correspondence: loreta.freitas@ufrgs.br; Fax: +55-51-3308-9823

Abstract: Floral syndromes are known by the conserved morphological traits in flowers associated with pollinator attraction, such as corolla shape and color, aroma emission and composition, and rewards, especially the nectar volume and sugar concentration. Here, we employed a phylogenetic approach to investigate sequences of genes enrolled in the biosynthetic pathways responsible for some phenotypes that are attractive to pollinators in Solanaceae genomes. We included genes involved in visible color, UV-light response, scent emission, and nectar production to test the hypothesis that these essential genes have evolved by convergence under pollinator selection. Our results refuted this hypothesis as all four studied genes recovered the species' phylogenetic relationships, even though some sites were positively selected. We found differences in protein motifs among genera in Solanaceae that were not necessarily associated with the same floral syndrome. Although it has had a crucial role in plant diversification, the plant–pollinator interaction is complex and still needs further investigation, with genes evolving not only under the influence of pollinators, but by the sum of several evolutionary forces along the speciation process in Solanaceae.

Keywords: Solanaceae; molecular evolution; plant-pollinator interaction; ODO1; MYB-FL; NEC1; DFR



Citation: Pereira, A.G.; Guzmán-Rodríguez, S.; Freitas, L.B. Phylogenetic Analyses of Some Key Genes Provide Information on Pollinator Attraction in Solanaceae. *Genes* **2022**, *13*, 2278. <https://doi.org/10.3390/genes13122278>

Academic Editor: Serena Aceto

Received: 26 October 2022

Accepted: 1 December 2022

Published: 3 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The plant–pollinator interaction occurs through a set of floral traits attractive to pollinators that are determined by genes in association with the environment, which favor specific or general interactions. The classic characterization for floral syndromes involves specific interactions that would occur by the convergent evolution of floral traits to the preferences of groups of effective pollinators, which in turn would increase the reproductive success of flowering plants [1,2]. However, this concept is often based on datasets that frequently include qualitative traits, such as flower color, scent, size, symmetry, and orientation, as well as the timing of anthesis, the position of sexual organs, UV-light response, and rewards. Rarely, quantitative characteristics, such as the corolla shape and the length of the corolla tube, are also included. For this reason, there is a recent debate encouraging the exploration of new areas of phenotypic evolution, mainly considering the (post-)genomic era [3].

In Solanaceae, some species have served as models for the identification of genes involved in the transition of floral traits during the pollinator shifts [4–8]. In the genus *Petunia*, the transition from purple to white-flowered species is due to a premature stop codon in the anthocyanin 2 (AN2; an anthocyanin pathway gene) that makes the protein non-functional [9]. Likewise, an extra single-point mutation in the same gene leads to the re-functionalization of a functional protein, which re-introduces the pink-colored flowers [10]. These changes promote the transition from bee pollination observed in short-corolla-tube, pink-colored species, to hawkmoth pollination in long-corolla-tube, white-flowered species and, again, to bee pollination in long-corolla-tube, pink-flowered ones. In *Nicotiana*, the later activation of di-hydroflavonol-4-reductase (DFR; an anthocyanin pathway early gene)

during floral development decreases anthocyanidin accumulation, and the interaction between DFR and other genes in the anthocyanin and flavonoid pathways promotes the transition from white to dark-pink flowers and their respective pollinators [11]. The upregulation of the flavonol synthesis pathway due to the changes in the promoter of the transcription factor R2R3 MYB (MYB-FL) promoted the gain of UV absorbance that attracts nocturnal pollinators in *Petunia* species [5], and the loss of this characteristic by the inactivation of MYB-FL was related to the transition to hummingbird pollination [10]. Moreover, changes in the pollinating agent are related to changes in the floral odor emission. The increase in bouquet complexity during the shift from bee to hawkmoth pollination in *Petunia* species involved the modulation of the benzoic acid/salicylic acid methyltransferase (BSMT) and benzoyl-CoA:benzyl alcohol/phenylethanol benzoyltransferase (BPBT) genes in the benzene/phenylpropanoid (FVBP) metabolic pathway, and the loss of function of the cinnamate-CoA ligase (CNL) gene and the reduction in the ODORANT1 (ODO1) expression culminated in the loss of bouquet emission during the shift from the hawkmoth to hummingbird pollination [12].

The analysis of evolutionary changes at DNA and protein levels can allow for the understanding of the evolution of convergent phenotypic traits throughout the floral syndromes and their transitions [13]. The natural selection exerted by the plant–pollinator interactions can act even in convergent adaptive substitutions at diverse taxonomic scales [9,14–16]. Phylogenetic relationships among genes rescue the evolutionary history of the sequences, revealing evolutionary pressures, duplications or losses [17], and punctual changes, sometimes producing trees with different topologies when compared with the species trees.

To better understand the evolutionary history of floral syndromes and some genes related to phenotypes considered attractive to pollinators in *Petunia*, we selected the gene DFR from the pigment biosynthesis [18]; the bidirectional sugar transporter (NEC1) which is a crucial component of nectar production in *Petunia* [19]; the MYB-FL, a transcription factor involved in the UV-light response [5]; and the ODO1, which regulates the biosynthesis of floral scent [20]. We obtained the nucleotide sequences of DFR, ODO1, MYB-FL, and NEC1 from available the genomes of Solanaceae species and reconstructed the phylogenetic tree of each gene's copies. We also tested for the presence of positive selection in each gene. Therefore, we aimed to verify whether genes related to pollinator attraction are conserved among Solanaceae species due to convergence or if their evolutionary history reflects the common ancestry of each genus.

2. Materials and Methods

2.1. Acquisition and Characterization of Plant Coding Sequences

We conducted a comprehensive homology search based on the BLAST method [21] to obtain the amino acid, genomic, and coding DNA sequences (CDS) of DFR, ODO1, MYB-FL, and NEC1 from the online database National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; accessed on 17 October 2022), and Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>; accessed on 17 October 2022). We obtained the *Petunia secreta* genome from NCBI JAFBXY000000000 project PRJNA674325 and the *Petunia exserta* draft genome from DNAZoo (https://www.dnazoo.org/assemblies/Petunia_exserta; accessed on 17 October 2022).

We used the *P. secreta* MYB-FL (KT962949) and *Petunia hybrida* DFR (X79723.1) and ODO1 (AY705977) gene sequences as queries to carry out BLASTn and BLASTp to obtain CDS and proteins, respectively, and *P. hybrida* NEC1 gene (AF313914.1) to carry out tBLASTx and BLASTp for NEC1 CDS and protein sequences. We selected sequences with a cutoff e-value $\geq 2 \times 10^{-40}$ in BLASTn and BLASTp, and e-value = 1×10^{-70} in tBLASTn. We selected a new query for each genus when the sequences did not reach such values (Table S1), improving the sequences' filtering. All identical, redundant, partial, and incomplete sequences were visually identified and manually eliminated, and only the full-length coding sequences were retained in the final data set.

2.2. Multiple Alignments and Gene Structure

To obtain the intron–exon number and size, we aligned the CDSs per gene using the MUSCLE algorithm in MEGA-XI [22] with default settings. When the sequence differed from the expected pattern based on the query genes, we aligned the complete gene sequence and CDS to identify 5'-UTR and 3'-UTR regions and possible issues in genome montage. To check for dubious sequences, we used BLAST in NCBI and removed the doubtful parts if BLAST results matched with a different species than expected or did not match with any species. After that, we evaluated the open reading frame (ORF) in ExPasy Web Server (<https://web.expasy.org/translate/>; accessed on 17 October 2022) using FASTA format and default parameters. We used HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>; accessed on 17 October 2022) to find the protein domains for each gene. The secondary structure of such domains was predicted using the amino acid sequences in PSIPRED 4.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>; accessed on 17 October 2022). The transmembrane regions of NEC1 were predicted using the web TMHMM Server v. 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>; accessed on 17 October 2022) with FASTA format and default parameters.

The conserved protein motifs of each gene were investigated in Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) v.5.3.3 (<http://meme-suite.org/tools/meme>; accessed on 17 October 2022) with default parameters, changing the number of motifs until the best sequence coverage was achieved. We generated the multiple protein sequence alignments using GenomeNet Sequence Analysis CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>; accessed on 17 October 2022) with default parameters. We used these alignments to highlight the conserved amino acid in a BOXSHADE analysis (<http://sourceforge.net/projects/boxshade/>; accessed on 17 October 2022).

2.3. Gene Trees Reconstruction

We reconstructed the phylogenetic tree for each gene using both CDS and protein sequences to explore the evolutionary relationships for DFR, ODO1, MYB-FL, and NEC1 throughout the Solanaceae species. We used *Arabidopsis thaliana* sequences retrieved from The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>; accessed on 17 October 2022) as an outgroup. The dataset was filtered by alignment confidence scores (0.003, 99.6% remaining columns) with GUIDANCE [23] using Guidance Web Server (<http://guidance.tau.ac.il/>; accessed on 17 October 2022). Maximum likelihood phylogenetic analyses were performed using IQ-TREE [24] as implemented in IQ-TREE Web Server (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>; accessed on 17 October 2022). We ran 1000 bootstrap (BS) replicates with ultrafast bootstrapping [25] and considered only the branches with BS > 80% as well-supported. The best evolutionary substitution model was set to auto-determination with the ModelFinder option [26] in IQ-TREE. For CDS, the best model based on the Bayesian information criterion (BIC) for each gene was MGK+F1X4_G4 for DFR; GY+F1X4+G4 for ODO1 and NEC1; and TIM3+P+G4 for MYB-FL. For protein sequences, the best BIC-selected models were JTT+G4 for DFR; FLU+G4 for ODO1 and MYB-FL; and CpREV+G4 for NEC1. We used FigTree v.1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>; accessed on 17 October 2022) to visualize the trees and the branch support.

2.4. Molecular Evolutionary Analyses

To test for natural selection signatures in genes related to pollinator attraction, we estimated the ratio (ω) between non-synonymous (dN) and synonymous nucleotide substitutions (dS). We used the alignments and respective phylogenetic trees as inputs to investigate natural selection in maximum-likelihood models using CODEML [27] software implemented in EasyCodeML (<https://github.com/BioEasy/EasyCodeML>; accessed on 17 October 2022). The ω values are a useful measurement for estimating positive selection (advantageous changes if $\omega > 1$), purifying selection (deleterious mutations if $\omega < 1$), or neutral shifts (if $\omega = 1$). We used codon-based models considering variable rates of selection between sites and compared three pairs of site-specific models [28]. The models M3, M2a,

and M8 consider the occurrence of positive selection sites ($\omega > 1$), whereas models M0, M1, and M7 are their respective null models. We used the likelihood ratio test (LRT) between the pairs of models to verify which of them better fits our data. We obtained the LRT by calculating twice the log-likelihood difference between pairs of models ($2\Delta L$), with the chi-square (χ^2) distribution and the number of freedom degrees equal to the number of additional parameters in the more complex model [29]. We considered the ω values not uniformly distributed, and selection could be discussed if the LTR was significant ($p < 0.01$) when comparing M0 vs. M3. A significant LTR could indicate a positive selection when comparing the other model pairs. In these cases, we employed the Empirical Bayes (NEB) and Bayes Empirical Bayes (BEB) approaches to identify the amino acids that would be under positive selection (posterior probability, $PP \geq 0.9$). If the LTR was not significant when comparing M1a vs. M2a, it could indicate that sites were under purifying selection.

3. Results

3.1. Identification of Gene Sequences in Solanaceae

We obtained the sequences of DFR, ODO1, MYB-FL, and NEC1 genes from 17 complete Solanaceae genomes, *P. hybrida*, and *A. thaliana* (Tables S1 and S2). We found a single copy for most genes per species, with a few exceptions (Table 1). The two *Nicotiana attenuata* MYB-FL protein sequences differed by 35.2%; *Nicotiana tomentosiformis* had two MYB-FL identical protein sequences, whereas CDS differed in 25% of sites. The two *A. thaliana* ODO1 proteins differed in 55.6% of amino acids. The two allotetraploid species, *Nicotiana. tabacum* and *Nicotiana benthamiana*, displayed two copies for each gene, except *N. benthamiana* MYB-FL. However, we did not find MYB-FL sequences in *P. hybrida* and *Solanum melongena* or NEC1 in *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* and var. *zunla*.

Table 1. Solanaceae species with complete genomes available at Sol Genomics and NCBI, highlighting the species ploidy and number of sequences recovered per species for the genes di-hydroflavonol-4-reductase (DFR) and nectar 1 (NEC1), and the transcription factors odorant 1 (ODO1) and MYB-FL.

Species	Ploidy	Copy Number				Pollinator
		DFR	ODO1	MYB-FL	NEC1	
<i>Petunia axillaris</i>	2n	1	1	1	1	Ha
<i>Petunia exserta</i>	2n	1	1	1	1	Hu
<i>Petunia hybrida</i>	2n	1	1	0	1	B
<i>Petunia inflata</i>	2n	1	1	1	1	B
<i>Petunia secreta</i>	2n	1	1	1	1	B
<i>Capsicum annuum</i>	2n	1	1	1	1	B
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	2n	1	1	1	0	B
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>zunla</i>	2n	1	1	1	0	B
<i>Nicotiana attenuata</i>	2n	1	1	2	1	Ha/Hu
<i>Nicotiana benthamiana</i>	4n	2	2	1	2	X
<i>Nicotiana sylvestris</i>	2n	1	1	1	1	Ha
<i>Nicotiana tabacum</i>	4n	2	2	2	2	Hu
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	2n	1	1	2	1	B
<i>Solanum lycopersicum</i>	2n	1	1	1	1	B
<i>Solanum melongena</i>	2n	1	1	0	1	B
<i>Solanum pennellii</i>	2n	1	1	1	1	B
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	2n	1	1	1	1	B
<i>Solanum tuberosum</i>	2n	1	1	1	1	B
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2n	1	2	1	1	-
Total		21	22	20	19	

2n—diploid; 4n—allotetraploid; Ha—hawkmoth; Hu—hummingbird; B—bee; X—*N. benthamiana* is autogamous.

The gene domains identified in HMMER corresponded to those predicted for each gene. For example, all DFR sequences showed a conservative epimerase domain. The NAD(P)H-binding site was highly conserved, except in *A. thaliana*, *N. benthamiana*, and

C. annuum, the last one with an incomplete sequence. We detected an aspartate (instead of asparagine) at the 143rd site as a conserved site in Solanaceae, except for in *N. benthamiana* (Figure S1). At the 154th site, we found glutamine (instead of the conserved glutamate) in the *Petunia* species.

Two R2R3 domains were observed in most MYB-FL and ODO1 genes (Figure S2). However, only one of these domains was retrieved from ODO1 in *P. inflata* and MYB-FL in *C. annuum* varieties. The ODO1 gene had a more conserved R2R3 domain among Solanaceae species than MYB-FL. For the ODO1 R2R3 domain in the *Petunia* species, asparagine at the 27th site and alanine at the 83rd site were replaced by serine residues. In *Capsicum*, alanine at the 19th position was replaced by threonine, and leucine at the 77th site by methionine. In *Solanum* species, we detected the substitution of an aspartate residue by glutamate at the 72nd site. At the 20th site, we observed the conserved glutamate, except in some *Nicotiana* species that had an aspartate in this position. All sequences of NEC1 presented the two MtN3/saliva domain (Figure S3), except *P. secreta* and *C. annuum* var. *zunla*, which had only one domain (Table S2).

The search for conserved motifs in each gene using MEME revealed that DFR (Figure 1) and ODO1 (Figure 2B) were more conserved among the species than other sequences. For example, in the DFR gene, we identified six motifs (Figure S4) shared among genera, and only *S. lycopersicum* and *S. pimpinellifolium* lost motif 4. Motifs 2 to 6 corresponded to the epimerase domain. In the ODO1 gene, we identified ten motifs (Figure S5); only *P. inflata* lost motifs 4 and 5, and *S. tuberosum* lost motif 5. All ODO1 motifs were observed in all genera, with motifs 1 and 2 corresponding to the R2R3 domain in this gene.

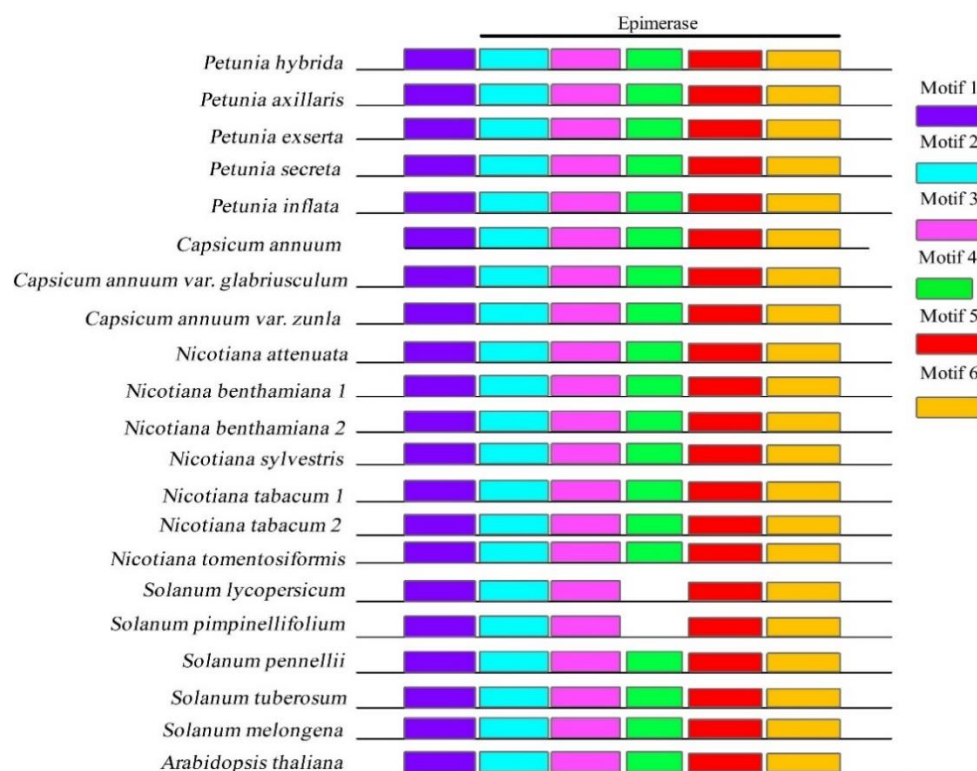


Figure 1. Conserved motifs of DFR protein sequences. The motifs are indicated by a numbered box and different colors; gray lines indicate non-conserved sequences. The motifs' length is proportional to the sequence size. The epimerase domain is indicated on top by a black line.



Figure 2. Conserved motifs of (A) MYB-FL and (B) ODO1 protein sequences. Both genes are part of the MYB family. The motifs are indicated by a numbered box and different colors; grey lines indicate non-conserved sequences. The motifs' length is proportional to the sequence size. The R2R3 domain is indicated on top by a black line.

The MYB-FL gene displayed 13 motifs (Figures 2A and S6), 8 of them observed in the *Petunia* species, except for *P. exserta*, in which only 4 motifs were found. Among the *Nicotiana* species, we found seven motifs in *N. tabacum* and *N. tomentosiformis*, which lost motif 8, and 8 motifs in the remaining species, except for in *N. benthamiana*, which had an incomplete gene with only three motifs (motifs 1–3). The *Solanum* species had seven motifs, two of which were exclusive (motifs 9 and 12). No species displayed all the observed 13 MYB-FL motifs. Motifs 1 and 2 corresponded to the R2R3 domain, and only motifs 1 to 3 were shared among all Solanaceae species. *Solanum* and *Capsicum* species shared motif 10, and motif 8 was observed in the *Petunia*, *Nicotiana*, and *Solanum* species. However, only the *Solanum* species did not differ regarding the number of motifs.

The NEC1 gene had ten motifs (Figures 3 and S7), none of which were exclusive. Motifs 2 and 3 corresponded to the MtN3/saliva domain. The *Petunia* species had nine motifs, all observed in *P. axillaris* and *P. inflata*, and *P. secreta* displayed three motifs, losing motifs 5 to

10. *C. annuum* var. *zunla* had four motifs in the NEC1 gene, and *Solanum* species revealed an inverted order regarding motifs 7, 8, and 10 compared with *Petunia*.

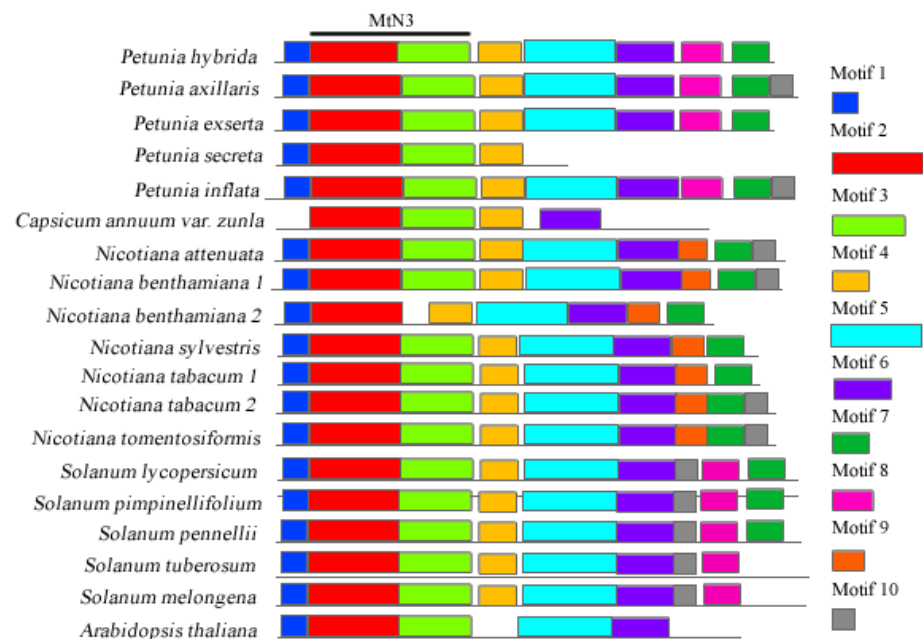


Figure 3. Conserved motifs of NEC1 protein sequences. The motifs are indicated by a numbered box and different colors; grey lines indicate non-conserved sequences. The motifs' length is proportional to the sequence size. The MtN3 domain is indicated on top by a black line.

3.2. Phylogenetic Relationships

We explored the evolutionary relationships of the DFR, ODO1, MYB-FL, and NEC1 genes through their CDS and protein sequences obtained from Solanaceae species. Sequences from each genus were grouped with high support (Figures 4–7), and we observed that all genes more closely reflected the infrageneric evolutionary position than other relationships, with clades corresponding to the *Petunia*, *Nicotiana*, *Capsicum*, and *Solanum* genera.

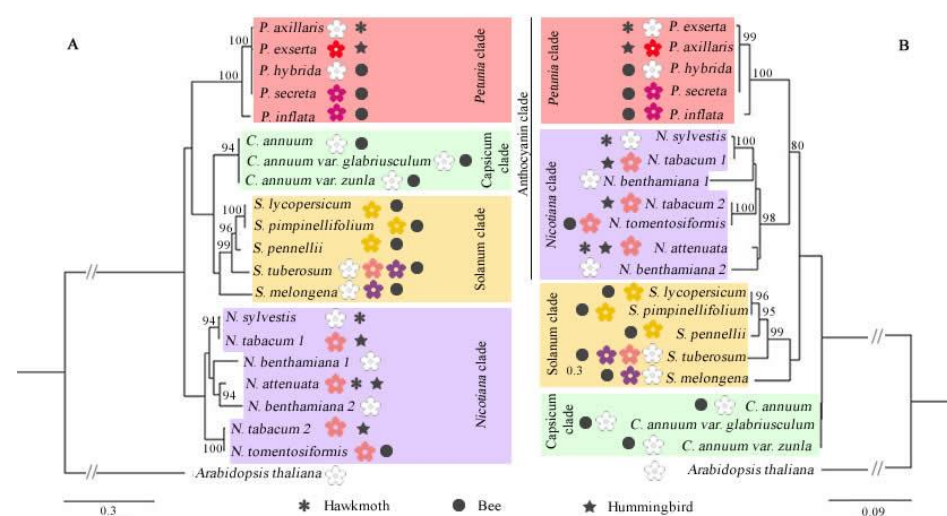


Figure 4. Phylogenetic relationships of DFR gene sequences retrieved from 19 complete Solanaceae species genomes. Maximum likelihood phylogenetic tree based on CDS sequences (A) and protein sequences (B). Only bootstraps > 80% are shown above the branches. The dark symbols indicate the pollination syndrome and colored flower cartoons represent each species' visible flower color. The absence of pollination syndrome symbol in *N. benthamiana* indicates autogamy in this species.

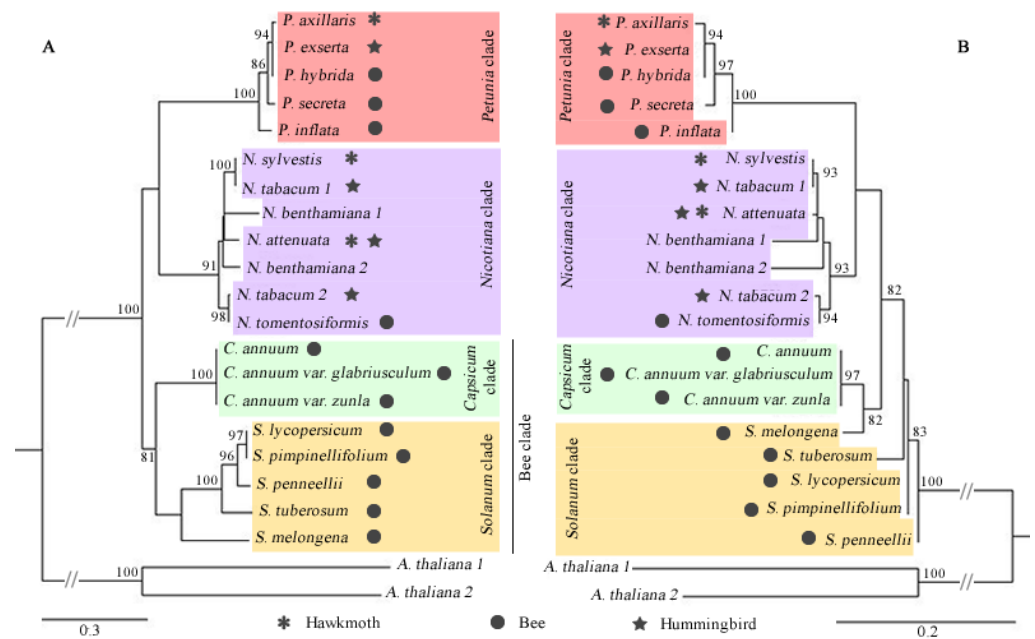


Figure 5. Phylogenetic relationships of ODO1 gene sequences retrieved from 19 complete Solanaceae species genomes. Maximum likelihood phylogenetic tree based on CDS sequences (A) and protein sequences (B). Only bootstrap > 80% are shown above the branches. The dark symbols indicate the pollination syndrome and the absence of pollination syndrome symbol in *N. benthamiana* indicates autogamy in this species.

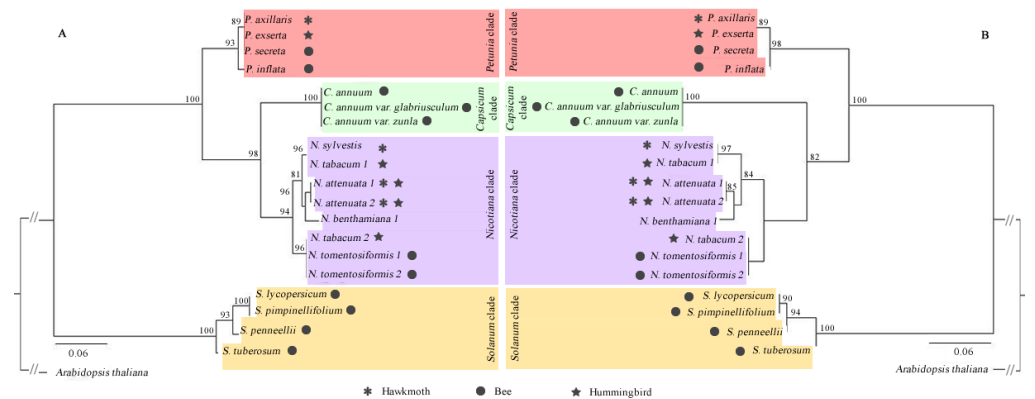


Figure 6. Phylogenetic relationships of MYB-FL gene sequences retrieved from 19 complete Solanaceae species genomes. Maximum likelihood phylogenetic tree based on CDS sequences (A) and protein sequences (B). Only bootstraps > 80% are shown above the branches. The dark symbols indicate the pollination syndrome and the absence of pollination syndrome symbol in *N. benthamiana* indicates autogamy in this species.

DFR and ODO1 were conserved genes, so the low variation interfered with the positioning of the branches in the phylogenetic tree (Figures 4 and 5). MYB-FL and NEC1 were more variable genes, and the phylogenetic trees showed similar results (Figures 6 and 7). However, the relationships between clades varied depending on the analyzed gene. With that said, the tree’s topology based on these genes was compatible with the phylogenetic signal of the Solanaceae genera.

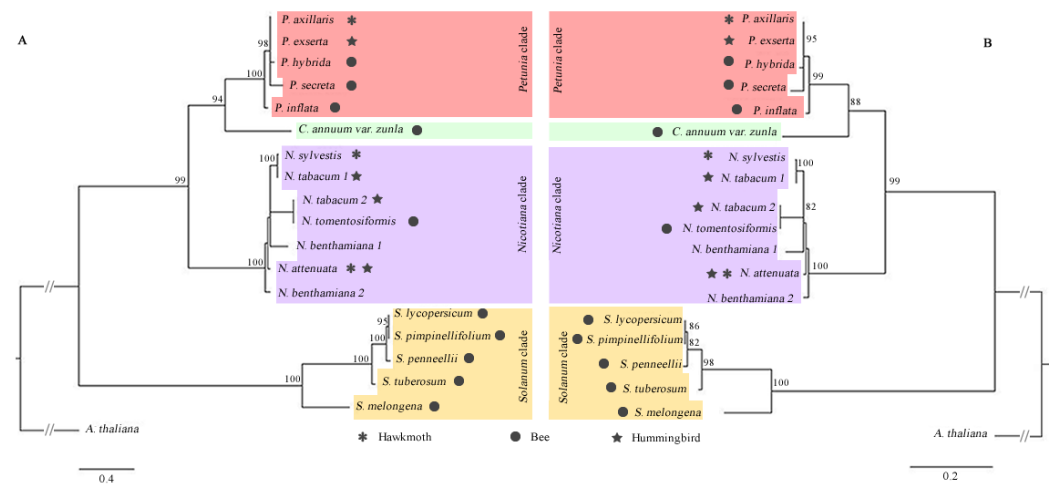


Figure 7. Phylogenetic relationships of NEC1 gene sequences retrieved from 19 complete Solanaceae species genomes. Maximum likelihood phylogenetic tree based on CDS sequences (A) and protein sequences (B). Only bootstraps > 80% are shown above the branches. The dark symbols indicate the pollination syndrome and the absence of pollination syndrome symbol in *N. benthamiana* indicates autogamy-pollination in this species.

3.3. Analyses of Selection

We estimated the nucleotide substitution rates to detect natural selection acting on genes related to pollinator attraction in Solanaceae ($\omega = dN/dS$). All genes showed significant LTR ($p < 0.01$) values in the comparison of M0 vs. M3, indicating $dN > dS$ (amino acid changing). In M1a vs. M2a, the LTR was not significant ($p > 0.01$) for all genes, indicating purifying selection in ca. 90% of sites in MYB-FL and ODO1, 85% in DFR, and 75% in NEC1, with low divergence during these genes' evolutions. The M7 vs. M8a of all genes was not significant (Table S3).

4. Discussion

Here, we analyzed four genes that belong to the biosynthetic pathways of compounds involved in the pollinators' attraction to plants. We characterized these genes from Solanaceae genomes and compared them based on the premise that if the primary driver of diversification in these species was plant–pollinator interaction, then genes should be evolutionarily related following the plant species' floral syndromes, at least in part, independently from the species relationships.

We selected genes from key pathways related to floral traits, such as visible color, response to UV light, aroma emission, and nectar production. We obtained a scenario for Solanaceae DFR, ODO1, MYB-FL, and NEC1 genes that indicated phylogenetic signals following the species' evolutionary relationships instead of convergence for these genes. As sampling is essential in phylogenetic studies, the results should be taken with caution [30]. Despite using the genomes deposited in the databases, our sampling for each genus encompassed partial or even reduced proportions (*Petunia*, 4/~15 spp. [31]; *Solanum*, 5/~2000 spp. [32]; *Nicotiana*, 5/~82 spp. [33] and *Capsicum*, 1/~35 spp. [34]). For *Petunia*, which was the main focus of this work, we included the sequences of the two evolutionary clades (long- and short-corolla-tube clades) and the representative species of all floral syndromes in the genus [35].

The scenario obtained in this work reinforces the proposal [36,37] that floral syndromes are more complex and have more fluid processes than initially thought [29], where sets of floral traits associated with particular pollinators' functional groups are expected to become convergent, and similar floral morphologies would reflect the same kind of pollinator even in distantly related plant taxa [2]. Moreover, pollinators could directionally select the floral traits [38], acting as drivers for diversification [39,40], mainly under conditions of reproductive isolation and adaptation.

Different functional groups mediate pollination in Solanaceae, and several floral syndromes evolved many times in the family. Indeed, there are several examples of species that, despite displaying all traits correlated with a specific syndrome, are pollinated by different functional groups [37].

According to the predicted phenotype for the floral syndromes [1], bee-pollinated species would have visible colors ranging from violet to intense yellow, usually presenting nectar and pollen guides in their petals, producing detectable odor and nectar with a high sugar concentration. As they are pollinated by diurnal insects, these species would not be UV-light-responsive. In turn, hawkmoth-pollinated species would emit a strong nocturnal odor, have white or pale-yellow flowers, respond to UV light, and produce large volumes of diluted nectar. The hummingbird-pollinated species would display flowers, usually with bright colors such as red or orange, without an odor and producing large amounts of nectar with a low sugar concentration.

4.1. Visible Colors and UV-Light Response

We analyzed the DFR gene and MYB-FL transcription factor regarding visible colors and UV-light response phenotypes. DFR is part of the anthocyanin biosynthesis pathway that occurs as a single-copy gene in several angiosperm species, such as *Petunia* [41] and *Solanum* [42,43], or duplicated, due to polyploidization as in *Nicotiana* [11].

N. tabacum is an allotetraploid and hummingbird-pollinated species that displays flower colors varying from light pink to magenta [44]. Those colors are outside the range of the diploid, white-flowered progenitor *N. sylvestris*, a nocturnal hawkmoth-pollinated species [45], and the dark-pink-flowered *N. tomentosiformis*, a bee-pollinated species [46]. In *N. tabacum*, the reaction between DFR and the product of other genes modulates the flower color [11], with DFR converting the precursors of flavonols into the precursors of anthocyanins. The later activation of DFR during floral development generates high ratios and tends to provide lower anthocyanidin accumulation, resulting in light-pink flowers in *N. tabacum*. The parental species *N. sylvestris* shows low levels of DFR throughout floral development, whereas *N. tomentosiformis* displays higher levels in the initial bud stages [11]. This pattern suggests that DFR and its interaction with other compounds in the anthocyanin pathway are enrolled in the transition between white and dark-pink flowers and their respective pollinators.

The transcription factors anthocyanin 1 (AN1) and anthocyanin 2 (AN2) induce anthocyanin production [18]. The AN2 activates DFR and other genes downstream in the anthocyanin biosynthetic pathway [10]. In *N. tabacum* [47] and *P. axillaris* [9,10], both white-flowered, the AN2 protein is not functional due to a premature stop codon. Moreover, a non-functional AN2 in *Petunia* is considered sufficient to explain its transition from a purple- to a white-flowered species [9], with the regain of a functional gene being responsible for the reversion of the pink color [10]. Similarly, the white flowers in *N. sylvestris* could be related to the absence of an AN2 ortholog in this species [11].

The purple-colored, UV-reflective, and bee-pollinated flowers observed in *P. inflata* represent the ancestral state of the genus *Petunia* [48]. From this broadly distributed ancestor, two divergent lineages derived [49], one with colored flowers (purple corollas and blue pollen), currently represented by the short-corolla-tube species, and another albino lineage that originated the long-corolla-tube species *P. axillaris*, *P. exserta*, and *P. secreta*, which have divergent floral syndromes. *P. axillaris* has white and hawkmoth-pollinated flowers [5,50] and, as in *N. sylvestris*, has entire DFR coding regions. Its capacity to absorb UV, which attracts nocturnal pollinators, occurs with the upregulation of the transcription factor MYB-FL promoter, controlling the expression of genes in the flavonol synthesis pathway [5]. The pink color in *P. secreta*, recovered by the resurrection of the AN2 gene by a single mutation, and the loss of UV absorbance are due to the inactivation of MYB-FL [10].

P. exserta has bright red flowers, intensely pigmented with anthocyanins despite an inactive AN2 gene [10]. The DFR of all *Petunia* species rendered non-functional the precursor of the red anthocyanin, dihydrokaempferol [51]. In species that accept dihydrokaempferol,

a 26 amino acid region in DFR determines the substrate specificity, with a conserved asparagine at the 134th site and glutamate at the 145th site [52] which correspond to the 143rd and 154th positions in our alignment, respectively. In *Petunia*, these amino acids are replaced with aspartate (the most common among the Solanaceae species) and glutamine, respectively. The molecular specificity mechanism is unknown, but this can alter the substrate recognition by DFR [52]. In addition, *P. exserta* loses the UV absorbance ability due to a frameshift mutation in MYB-FL that inactivates a flavonol pathway [5]. UV-reflectance is a relevant characteristic of red flowers [53], such as *P. exserta*, that attracts hummingbirds [54]. Regaining red anthocyanins involves the upregulation of other MYB transcription factors that replace the ancestral function of AN2 [55]. Similar to *P. exserta*, *N. benthamiana* has an incomplete MYB-FL protein and, unexpectedly, due to its polyploid condition, only one gene copy was recovered from the genome. It is inferred from these characteristics that *N. benthamiana* could be UV-light-reflective, but further investigation is still necessary.

The DFR gene shows well-conserved sequences, and we recovered the entire coding region, even from species with white flowers, which do not produce anthocyanins. However, the losses and shifts in flower pigmentation are related to changes in gene expression, a different phase of development, or different color pathways and not necessarily to structural mutations in this gene. For example, the MYB-FL was more diverse, with mutations that impacted the protein's function. Different colors and UV-light responses enable pollinators to identify rewards associated with their needs and preferences. Vibrantly colored flowers, visual tracking, and UV-reflectance are associated with diurnal pollinator attraction, affecting species such as bees and hummingbirds [56], whereas white and UV-absorbent flowers are usually related to nocturnal pollinators, such as hawkmoths [57].

4.2. Odor Emission

The ODO1 is a transcription factor that regulates the benzene/phenylpropanoid (FVBP) metabolic pathway responsible for the biosynthesis of floral scents [58]. In *P. axillaris* and *P. hybrida* var. Mitchell, benzenes are the main volatiles emitted and exert strong levels of attraction for the hawkmoth *Manduca sexta* [9]. These volatiles are primarily produced in petals during the night, coinciding with the peak foraging activity of the pollinator [59]. The quantity and complexity of the volatiles emitted by *P. axillaris* and *P. hybrida* are related to the expression of genes in the benzoic acid pathway. Such genes moderately increase the expression of some proteins in the FVBP [12]. The scent absence in *P. exserta* is related to the inactivation of the cinnamate-CoA ligase (CNL) gene and not to the loss of function in the ODO1 [60]. In turn, the bee-pollinated *P. inflata* emits volatile benzaldehyde, but no other compounds are present in *P. axillaris* [30]. This difference in scent composition and emission is related to the differential expression of genes in the FVBP pathway. The absence of methyl benzoate in *P. inflata* aroma is attributed to a blockage in the last step in the pathway [12].

Similar to what was found in the *Petunia* clade, the *Nicotiana* species exhibit great diversity in terms of pollinators. Moth- and hawkmoth-pollinated species such as *N. sylvestris* and *N. attenuata* emit scents at night, regulated by the circadian cycle [61]. The predominant floral fragrance is benzyl alcohol in *N. sylvestris* [62] and benzyl acetone in *N. attenuata* [63]. Moreover, *N. attenuata* has a small number of flowers that open at dusk, interacting with day-active pollinators that are still foraging at that time, and there are suggestions that, despite hummingbirds not being guided by scent, benzyl acetone may work as an attractant in the taste of nectar [63].

4.3. Floral Rewards

Many plants use nectar as a floral reward, and its composition meets the preferences of pollinators [64]. NEC1 is expressed in floral nectaries, acting as a sugar efflux transporter, which contributes to the sugar concentration and composition of nectar [18]. The *Nicotiana* bee-pollinated or autogamous species show a reduced volume of nectar; hummingbird-pollinated species have a slightly higher volume of nectar; and the hawkmoth-pollinated

species produce large volumes of nectar [65]. These patterns were also detected in *Petunia* species with the same floral syndromes [6,64,66].

Pollinated by bees, *P. inflata* and *C. annuum* have low volumes of nectar, consisting predominantly of glucose and fructose. In *P. inflata*, the sucrose concentration is proportional to the other sugars [64,66]. *P. secreta* has nectar with a concentration of sugars similar to that observed in hummingbird-pollinated species and a higher volume of nectar than expected for bee-pollinated species. However, due to the long floral tube, bees cannot access the nectar [36]. The NEC1 gene in *P. secreta* was recovered as an incomplete sequence, although sugar is found in the nectar, which requires further research on the gene functionality and sugar synthesis pathway. The *Solanum* species have nectar-less flowers, and pollen is the floral reward for pollinators [67], similar to in *P. secreta* [36].

4.4. Gene Conservation by Purifying Selection

Our results indicated that DFR, MYB-FL, ODO1, and NEC1 are under purifying selection. Flavonols are essential not only for floral attraction but also for controlling pollen-tube growth and high-temperature stress [68], with MYB-FL being one of the first regulators in this pathway [10]. DFR is conserved among white-colored species [55]. However, anthocyanins are also present in vegetative organs and fruits, protecting against the effects of UV light and temperature stresses [69–71]. In odorless species such as *P. exserta*, pathway inactivation does not occur by the modification of ODO1 [60], and NEC1, in addition to the transportation of sugar to nectar, has also been linked to the development of anthers and sugar transportation in fruits [72]. The conservation of the sequence and the maintenance of function by purifying selection indicates the importance of these genes for different pathways, not necessarily linked to pollinator attraction.

5. Conclusions

Our results revealed that the genes recovered the infrageneric phylogenetic relationships, with clades corresponding to the studied genera. Many genes reflected the species' most recent common ancestor within each genus. We found that DFR and ODO1 were the most conserved, whose phenotype shifts were not related to mutations but more likely to a differential expression among Solanaceae species. The inactivating mutation in MYB-FL seems to be the key to pollinator shifts, despite its well-conserved function in most Solanaceae species. The analyzed genes are related to the phenotypes attractive to pollinators, but their products and biosynthetic pathways also play other vital roles in plants. The history of these genes was probably designed not only by the interaction with pollinators but by the sum of several evolutionary forces along the speciation process in Solanaceae.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes13122278/s1>, Figure S1: Multiple sequence alignment of DFR protein domain in Solanaceae species; Figure S2: Multiple sequence alignment of MYB-FL (A) and ODO1 (B) R2R3 protein domain in Solanaceae species; Figure S3: Multiple sequence alignment of the NEC1 MtN3 protein domain in Solanaceae species; Figure S4: Logo of conserved motifs of DFR protein sequences; Figure S5: Logo of conserved motifs of ODO1 protein sequences; Figure S6: Logo of conserved motifs of MYB-FL protein sequences; Figure S7: Logo of conserved motifs of NEC1 protein sequences; Table S1: Accession numbers for the CDS sequences of DFR, ODO1, MYB-FL, and NEC 1 genes used in this study; Table S2: Accession numbers for the protein sequences of DFR, ODO1, MYB-FL, and NEC 1 genes used in this study; Table S3: Parameter estimates for Site Model and log-likelihood values under-tested models.

Author Contributions: Conceptualization, L.B.F.; methodology, A.G.P. and S.G.-R.; software, A.G.P. and S.G.-R.; validation, A.G.P. and S.G.-R.; formal analysis, A.G.P. and S.G.-R.; investigation, A.G.P. and S.G.-R.; resources, A.G.P. and S.G.-R.; data curation, A.G.P. and S.G.-R.; writing—original draft preparation, L.B.F. and A.G.P.; writing—review and editing, L.B.F.; visualization, L.B.F.; supervision, L.B.F.; project administration, L.B.F.; funding acquisition, L.B.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank Gina M. Cannarozzi and Cris Kuhlemeier for help with *Petunia* genomes, discussion, and suggestions on the manuscript; and Drieli Canal and João P.C. Filgueiras for fruitful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Faegri, K.; van der Pijl, L. *The Principles of Pollination Ecology*, 3rd ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1979; 244p.
2. Fenster, C.B.; Armbruster, W.S.; Wilson, P.; Dudash, M.R.; Thomson, J.D. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2004**, *35*, 375–403. [[CrossRef](#)]
3. Dellinger, A.S. Pollination syndromes in the 21st century: Where do we stand and where may we go? *New Phytol.* **2020**, *228*, 1193–1213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Feng, C.-Y.; Han, J.-X.; Han, X.-X.; Jiang, J. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato. *Gene* **2015**, *573*, 261–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sheehan, H.; Moser, M.; Klahre, U.; Esfeld, K.; Dell’Olivo, A.; Mandel, T.; Metzger, S.; Vandenbussche, M.; Freitas, L.; Kuhlemeier, C. MYB-FL Controls gain and loss of floral uv absorbance, a key trait affecting pollinator preference and reproductive isolation. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 159–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Tiedge, K.; Lohaus, G. Nectar sugars and amino acids in day- and night-flowering *Nicotiana* species are more strongly shaped by pollinators’ preferences than organic acids and inorganic ions. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Colanero, S.; Perata, P.; Gonzali, S. What’s behind purple tomatoes? Insight into the mechanisms of anthocyanin synthesis in tomato fruits. *Plant Physiol.* **2020**, *182*, 1841–1853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Laimbeer, F.P.E.; Bargmann, B.O.; Holt, S.H.; Pratt, T.; Peterson, B.; Doulis, A.G.; Buell, C.R.; Veilleux, R.E. Characterization of the *F* locus responsible for floral anthocyanin production in potato. *G3 Genes Genomes Genet.* **2020**, *10*, 3871–3879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Hoballah, M.E.; Gübitz, T.; Stuurman, J.; Broger, L.; Barone, M.; Mandel, T.; Dell’Olivo, A.; Arnold, M.; Kuhlemeier, C. Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *Plant Cell* **2007**, *19*, 779–790. [[CrossRef](#)]
10. Esfeld, K.; Berardi, A.E.; Moser, M.; Bossolini, E.; Freitas, L.; Kuhlemeier, C. Pseudogenization and resurrection of a speciation gene. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, 3776–3786.e7. [[CrossRef](#)]
11. McCarthy, E.W.; Landis, J.B.; Kurti, A.; Lawhorn, A.J.; Litt, A. The genetic basis of flower color differences in *Nicotiana tabacum*. In *The Tobacco Plant Genome*; Ivanov, N.V., Sierro, N., Peitsch, M.C., Eds.; Compendium of Plant Genomes; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; pp. 175–193.
12. Amrad, A.; Moser, M.; Mandel, T.; de Vries, M.; Schuurink, R.C.; Freitas, L.; Kuhlemeier, C. Gain and loss of floral scent production through changes in structural genes during pollinator-mediated speciation. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 3303–3312. [[CrossRef](#)]
13. Christin, P.-A.; Weinreich, D.M.; Besnard, G. Causes and evolutionary significance of genetic convergence. *Trends Genet.* **2010**, *26*, 400–405. [[CrossRef](#)]
14. Strauss, S.Y.; Whittall, J.B.; Harder, K.D.; Barrett, S.C.H. Non-pollinator agents of selection on floral traits. In *Ecology and Evolution of Flowers*; Harder, L.D., Barrett, S.C.H., Eds.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2006; pp. 120–138.
15. Preston, J.C.; Hileman, L.C. Developmental genetics of floral symmetry evolution. *Trends Plant Sci.* **2009**, *14*, 147–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rosin, F.M.; Kramer, E.M. Old dogs, new tricks: Regulatory evolution in conserved genetic modules leads to novel morphologies in plants. *Dev. Biol.* **2009**, *332*, 25–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ames, R.M.; Money, D.; Ghatge, V.P.; Whelan, S.; Lovell, S.C. Determining the evolutionary history of gene families. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 48–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Grotewold, E. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 761–780. [[CrossRef](#)]
19. Muhlemann, J.K.; Klempien, A.; Dudareva, N. Floral volatiles: From biosynthesis to function. *Plant Cell Env.* **2014**, *37*, 1936–1949. [[CrossRef](#)]
20. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
21. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [[CrossRef](#)]

22. Penn, O.; Privman, E.; Landan, G.; Graur, D.; Pupko, T. An alignment confidence score capturing robustness to guide tree uncertainty. *Mol. Biol. Evol.* **2010**, *27*, 1759–1767. [[CrossRef](#)]
23. Nguyen, L.-T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 268–274. [[CrossRef](#)]
24. Hoang, D.T.; Chernomor, O.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q.; Vinh, L.S. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 518–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kalyaanamoorthy, S.; Minh, B.Q.; Wong, T.K.F.; von Haeseler, A.; Jermini, L.S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 587–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Yang, Z. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *24*, 1586–1591. [[CrossRef](#)]
27. Yang, Z. Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 1107–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Anisimova, M.; Yang, Z. Multiple hypothesis testing to detect lineages under positive selection that affects only a few sites. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *24*, 1219–1228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Proctor, M.; Yeo, P.; Lack, A. *The Natural History of Pollination*; Harper & Collins: London, UK, 1996; 479p.
30. Craig, J.M.; Kumar, S.; Hedges, S.B. Limitations of phylogenomic data can drive inferred speciation rate shifts. *Mol. Biol. Evol.* **2022**, *39*, msac038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Greppi, J.A.; Hagiwara, J.C.; Stehmann, J.R. A new species of *Petunia* (Solanaceae) from Corrientes, Argentina. *Phytotaxa* **2019**, *414*, 289–295. [[CrossRef](#)]
32. Kaunda, J.S.; Zhang, Y.-J. The genus *Solanum*: An ethnopharmacological, phytochemical and biological properties review. *Nat. Prod. Bioprospecting* **2019**, *9*, 77–137. [[CrossRef](#)]
33. Knapp, S.; Chase, M.W.; Clarkson, J.J. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon* **2004**, *53*, 73–82. [[CrossRef](#)]
34. Carrizo García, C.; Barfuss, M.H.J.; Sehr, E.M.; Barboza, G.E.; Samuel, R.; Moscone, E.A.; Ehrendorfer, F. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Ann. Bot.* **2016**, *118*, 35–51. [[CrossRef](#)]
35. Reck-Kortmann, M.; Silva-Arias, G.A.; Segatto, A.L.A.; Mäder, G.; Bonatto, S.L.; de Freitas, L.B. Multilocus Phylogeny Reconstruction: New Insights into the Evolutionary History of the Genus *Petunia*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2014**, *81*, 19–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rodrigues, D.M.; Caballero-Villalobos, L.; Turchetto, C.; Assis Jacques, R.; Kuhlemeier, C.; Freitas, L.B. Do we truly understand pollination syndromes in *Petunia* as much as we suppose? *AoB Plants* **2018**, *10*, ply057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Knapp, S. On ‘various contrivances’: Pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2010**, *365*, 449–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Yan, J.; Wang, G.; Sui, Y.; Wang, M.; Zhang, L. Pollinator responses to floral colour change, nectar and scent promote reproductive fitness in *Quisqualis indica* (Combretaceae). *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24408. [[CrossRef](#)]
39. Fregonezi, J.N.; Turchetto, C.; Bonatto, S.L.; Freitas, L.B. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. *Bot. J. Linn. Soc.* **2013**, *171*, 140–153. [[CrossRef](#)]
40. Gübitz, T.; Hoballah, M.E.; Dell’Olivo, A.; Kuhlemeier, C. *Petunia* as a model system for the genetics and evolution of pollination syndromes. In *Petunia: Evolutionary, Developmental and Physiological Genetics*; Gerats, T., Strommer, J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 29–49.
41. Huits, H.S.M.; Gerats, A.G.M.; Kreike, M.M.; Mol, J.N.M.; Koes, R.E. Genetic control of dihydroflavonol 4-reductase gene expression in *Petunia hybrida*. *Plant J.* **1994**, *6*, 295–310. [[CrossRef](#)]
42. Jiang, M.; Liu, Y.; Ren, L.; Lian, H.; Chen, H. Molecular cloning and characterization of anthocyanin biosynthesis genes in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Physiol. Plant.* **2016**, *38*, 163. [[CrossRef](#)]
43. Xiao, J.; Wang, Q.; Li, W.; Guo, H. Cloning and bioinformatical analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene from pigmented potato. *Plant Gene Trait.* **2012**, *2*, 7–14. [[CrossRef](#)]
44. McCarthy, E.W.; Berardi, A.E.; Smith, S.D.; Litt, A. Related allopolyploids display distinct floral pigment profiles and transgressive pigments. *Am. J. Bot.* **2017**, *104*, 92–101. [[CrossRef](#)]
45. Chase, M.W.; Paun, O.; Fay, M.F. Hybridization and speciation in angiosperms: A role for pollinator shifts? *BMC Biol.* **2010**, *8*, 45. [[CrossRef](#)]
46. McCarthy, E.W.; Arnold, S.E.J.; Chittka, L.; Le Comber, S.C.; Verity, R.; Dodsworth, S.; Knapp, S.; Kelly, L.J.; Chase, M.W.; Baldwin, I.T.; et al. The effect of polyploidy and hybridization on the evolution of floral colour in *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann. Bot.* **2015**, *115*, 1117–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Pattanaik, S.; Kong, Q.; Zaitlin, D.; Werkman, J.R.; Xie, C.H.; Patra, B.; Yuan, L. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco. *Planta* **2010**, *231*, 1061–1076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mäder, G.; Freitas, L.B. Biogeographical, ecological, and phylogenetic analyses clarifying the evolutionary history of *Calibrachoa* in South American grasslands. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2019**, *141*, 106614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Wijsman, H.J.W. On the interrelationships of certain species of *Petunia* II. Experimental data: Crosses between different taxa. *Acta Bot. Neerl.* **1983**, *32*, 97–107. [[CrossRef](#)]
50. Quattrocchio, F.; Wing, J.; van der Woude, K.; Souer, E.; de Vetten, N.; Mol, J.; Koes, R. Molecular analysis of the *Anthocyanin2* gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* **1999**, *11*, 1433–1444. [[CrossRef](#)]

51. Forkmann, G.; Ruhnau, B. Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*. *Z. Für Nat. C* **1987**, *42*, 1146–1148. [[CrossRef](#)]
52. Johnson, E.T.; Ryu, S.; Yi, H.; Shin, B.; Cheong, H.; Choi, G. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *Plant J.* **2001**, *25*, 325–333. [[CrossRef](#)]
53. Cronk, Q.; Ojeda, I. Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 715–727. [[CrossRef](#)]
54. Lorenz-Lemke, A.P.; Mäder, G.; Muschner, V.C.; Stehmann, J.R.; Bonatto, S.L.; Salzano, F.M.; Freitas, L.B. Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): A molecular and ecological analysis. *Mol. Ecol.* **2006**, *15*, 4487–4497. [[CrossRef](#)]
55. Berardi, A.E.; Esfeld, K.; Jäggi, L.; Mandel, T.; Cannarozzi, G.M.; Kuhlemeier, C. Complex evolution of novel red floral color in *Petunia*. *Plant Cell* **2021**, *33*, 2273–2295. [[CrossRef](#)]
56. Chen, Z.; Niu, Y.; Liu, C.-Q.; Sun, H. Red flowers differ in shades between pollination systems and across continents. *Ann. Bot.* **2020**, *126*, 837–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. White, R.H.; Stevenson, R.D.; Bennett, R.R.; Cutler, D.E.; Haber, W.A. Wavelength discrimination and the role of ultraviolet vision in the feeding behavior of hawkmoths. *Biotropica* **1994**, *26*, 427. [[CrossRef](#)]
58. Fenske, M.P.; Imaizumi, T. Circadian rhythms in floral scent emission. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Fenske, M.P.; Nguyen, L.P.; Horn, E.K.; Riffell, J.A.; Imaizumi, T. Circadian clocks of both plants and pollinators influence flower seeking behavior of the pollinator hawkmoth *Manduca sexta*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Colquhoun, T.A.; Marciniak, D.M.; Wedde, A.E.; Kim, J.Y.; Schwieterman, M.L.; Levin, L.A.; Van Moerkercke, A.; Schuurink, R.C.; Clark, D.G. A Peroxisomally localized acyl-activating enzyme is required for volatile benzenoid formation in a *Petunia × hybrida* Cv. ‘Mitchell diploid’ flower. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 4821–4833. [[CrossRef](#)]
61. Yon, F.; Kessler, D.; Joo, Y.; Kim, S.-G.; Baldwin, I.T. Fitness consequences of a clock pollinator filter in *Nicotiana attenuata* flowers in nature. *J. Integr. Plant Biol.* **2017**, *59*, 805–809. [[CrossRef](#)]
62. Loughrin, J.N.; Hamilton-Kemp, T.R.; Andersen, R.A.; Hildebrand, D.F. Volatiles from flowers of *Nicotiana sylvestris*, *N. otophora* and *Malus × domestica*: Headspace components and day/night changes in their relative concentrations. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2473–2477. [[CrossRef](#)]
63. Kessler, D.; Bing, J.; Haverkamp, A.; Baldwin, I.T. The defensive function of a pollinator-attracting floral volatile. *Funct. Ecol.* **2019**, *33*, 1223–1232. [[CrossRef](#)]
64. Brandenburg, A.; Kuhlemeier, C.; Bshary, R. Hawkmoth pollinators decrease seed set of a low-nectar *Petunia axillaris* line through reduced probing time. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 1635–1639. [[CrossRef](#)]
65. Kim, W.; Gilet, T.; Bush, J.W.M. Optimal concentrations in nectar feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16618–16621. [[CrossRef](#)]
66. Stuurman, J.; Hoballah, M.E.; Broger, L.; Moore, J.; Basten, C.; Kuhlemeier, C. Dissection of floral pollination syndromes in *Petunia*. *Genetics* **2004**, *168*, 1585–1599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Morse, A.; Kevan, P.; Shipp, L.; Khosla, S.; McGarvey, B. The impact of greenhouse tomato (Solanales: Solanaceae) floral volatiles on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) pollination. *Environ. Entomol.* **2012**, *41*, 855–864. [[CrossRef](#)]
68. Muhlemann, J.K.; Younts, T.L.B.; Muday, G.K. Flavonols control pollen tube growth and integrity by regulating ROS homeostasis during high-temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 11188–11197. [[CrossRef](#)]
69. Tian, J.; Han, Z.; Zhang, J.; Hu, Y.; Song, T.; Yao, Y. The balance of expression of dihydroflavonol 4-reductase and flavonol synthase regulates flavonoid biosynthesis and red foliage coloration in crabapples. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Gu, Z.; Chen, H.; Yang, R.; Ran, M. Identification of DFR as a promoter of anthocyanin accumulation in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. Ex Klotzsch) bracts under short-day conditions. *Sci. Hortic.* **2018**, *236*, 158–165. [[CrossRef](#)]
71. Shi, S.; Liu, Y.; He, Y.; Li, L.; Li, D.; Chen, H. R2R3-MYB transcription factor SmMYB75 promotes anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Sci. Hortic.* **2021**, *282*, 110020. [[CrossRef](#)]
72. Li, J.; Qin, M.; Qiao, X.; Cheng, Y.; Li, X.; Zhang, H.; Wu, J. A new insight into the evolution and functional divergence of SWEET transporters in chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*). *Plant Cell Physiol.* **2017**, *58*, 839–850. [[CrossRef](#)]

Capítulo 2

Can regulatory elements explain differences in *Petunia* floral syndromes?

Aléxia Gonçalves Pereira, João Pedro Carmo Filgueira, Loreta Brandão de Freitas

Artigo em preparação para ser submetido ao periódico *Molecular Genetics and Genomics*

Resumo

Elementos reguladores têm sido implicados em mudanças em vários processos fisiológicos, como fenótipos atraentes e recompensadores durante a interação planta-polinizador. Aqui, selecionamos seis genes-chave envolvidos no estabelecimento de síndromes florais no gênero *Petunia* para compreender o suposto papel dos elementos reguladores na transição dos polinizadores. Recuperamos as sequências genômicas dos genes MYB-FL, DFR, EOBII, ODO1, BPBT e NEC1 de genomas publicados anteriormente das espécies *P. axillaris*, *P. exserta*, *P. secreta* e *P. inflata*. Selecionamos genes envolvidos na determinação da cor, síntese e emissão de aroma e produção de néctar, e espécies que atraem diferentes polinizadores, apresentando fenótipos contrastantes em relação às síndromes florais. Analisamos os elementos reguladores considerando a estrutura e composição dos motivos e avaliamos os resultados sob a premissa de que espécies com a mesma síndrome floral evoluíram por convergência, enquanto diferenças nos polinizadores estariam relacionadas à divergência entre elas. Nossos resultados revelaram um forte sinal filogenético em diferentes síndromes florais, já que o ancestral comum mais recente foi o melhor indicador de elementos reguladores independentemente da síndrome floral. Para desvendar o cenário completo da evolução das síndromes de polinização em *Petunia*, outros estudos devem ser realizados analisando as vias completas de produção desses fenótipos e comparando genomas e transcriptomas florais.

Capítulo 3

Tracing the flower puzzle: Hybridization insights into *Petunia* pollination strategies

Aléxia Gonçalves Pereira, Alice Backes, Pedro Henrique Pezzi, Sebastián Guzmán-Rodrigues, Daniele Munareto Rodrigues, Loreta Brandão de Freitas

Artigo em preparação para ser submetido ao periódico *Journal of Heredity*

Resumo

As síndromes de polinização são definidas como um conjunto de fenótipos responsáveis por atrair um determinado grupo de polinizadores. Na presença de hibridação interespecífica entre espécies com síndromes florais diferentes, os híbridos podem perder um ou ambos os polinizadores dos parentais ou, ainda, adquirir uma nova guilda de vetores de pólen. No gênero *Petunia*, muitas populações híbridas naturais persistem ao longo de múltiplas gerações. Esses híbridos resultam de espécies com diferentes síndromes florais e seus polinizadores ainda são desconhecidos. Aqui, nosso objetivo foi identificar os potenciais polinizadores dos híbridos, comparando características florais típicas de cada síndrome de polinização entre espécies canônicas e seus híbridos F1. Para isso, nós cultivamos plantas em condições uniformes e avaliamos as cores na luz visível e luz UV, a morfologia da corola, o volume de néctar e a concentração de açúcares e a quantidade de pólen. Nossos resultados revelaram que algumas características parentais são dominantes, e a maioria dos híbridos apresentou características adequadas para atrair mariposas, enquanto outros têm igual potencial para atrair beija-flores e abelhas coletoras de pólen. Como subproduto dessas análises, identificamos características atrativas para abelhas nas três espécies canônicas, sugerindo que esses insetos poderiam ser o vetor de pólen nos cruzamentos interespecíficos naturais.

Capítulo 4

Comparing gene expression in canonical and interspecific hybrid individuals of *Petunia* with contrasting floral syndromes

Aléxia Gonçalves Pereira, Francieli Ortolan, Rogério Margis, Loreta Brandão de Freitas

Artigo em preparação para ser submetido ao periódico *Genetics and Molecular Biology*

Resumo

As angiospermas são altamente diversas, e a riqueza de espécies em plantas com flores está frequentemente relacionada à interação com polinizadores, uma vez que as espécies polinizadas pelo mesmo grupo de animais possuem conjuntos de características morfológicas idênticas ou semelhantes, conhecidas como síndromes florais. A hibridação interespecífica entre plantas que apresentam polinizadores diferentes pode levar os híbridos a ganhar um novo ou perder um ou ambos os polinizadores parentais. O gênero *Petunia* inclui espécies com diferentes polinizadores que se cruzam na natureza, constituindo populações estáveis ao longo do tempo. Os polinizadores responsáveis pelos cruzamentos interespecíficos e manutenção de populações híbridas são desconhecidos. Para entender o impacto da hibridação na atração de polinizadores, selecionamos seis genes envolvidos em características florais contrastantes (cor da corola, resposta à luz UV, emissão de aroma e volume e concentração de açúcar no néctar) para comparar sua expressão usando uma abordagem de qRT-PCR entre canônicos e híbridos interespecíficos. Os híbridos interespecíficos compartilham vários fenótipos semelhantes a uma das espécies parentais, sugerindo processos conservados entre eles. Nossos resultados revelaram um padrão de expressão complexo relacionado ao estabelecimento do fenótipo canônico e um perfil inesperado em híbridos, que variou por gene e não correspondeu às preferências dos polinizadores parentais.

Capítulo 5

Machine learning to infer trait-matching and predict floral syndromes in interspecific hybrids

Alexia Gonçalves Pereira, Bruno Bonatto, Loreta B. Freitas

Artigo em preparação para ser submetido ao periódico *Annals of Botany*

Resumo

A análise das síndromes florais e a identificação de polinizadores efetivos estão centradas preferencialmente em observações e experimentos de campo. Quando tais experimentos são inviáveis, uma alternativa emergente é aplicar métodos computacionais baseados em aprendizado de máquina, por exemplo. As espécies de *Petunia* podem hibridar naturalmente e algumas populações misturadas persistem ao longo do tempo. O provável polinizador das populações híbridas ainda precisa ser descoberto, apesar do tempo gasto na observação desses indivíduos. Aqui, pretendemos inferir o polinizador mais plausível para híbridos F1 entre espécies de *Petunia*. Obtivemos indivíduos canônicos e híbridos interespecíficos entre três espécies de *Petunia* e os mantivemos em casa de vegetação até florescerem. Avaliamos fenótipos comumente associados à atração e recompensa de polinizadores. Usamos três algoritmos de aprendizado de máquina e correspondência de características para inferir os prováveis polinizadores dos híbridos, baseando nosso trabalho no conceito de síndromes florais. Todos os indivíduos canônicos foram atribuídos a sua respectiva síndrome floral, enquanto os híbridos corresponderam primariamente às preferências de mariposas, seguidos por abelhas. Mais de 90% dos casos concordaram entre os algoritmos. Nossos resultados revelaram que o emprego de técnicas de aprendizado de máquina ajuda a identificar potenciais polinizadores em híbridos interespecíficos de *Petunia* que correspondem aos fenótipos florais e às preferências dos polinizadores. Nosso trabalho pode ajudar a planejar experimentos de campo e foi apoiado por descobertas anteriores para o gênero.

Considerações Finais

Neste trabalho, abordamos o papel da hibridação no estabelecimento de traços florais atrativos aos polinizadores influenciando o processo de diversificação do gênero *Petunia*. Ao longo dos cinco capítulos resultantes deste trabalho, conseguimos demonstrar a complexidade da interação entre planta e polinizador, avaliando os traços florais desde a genética até o fenótipo para estabelecimento das síndromes florais dos híbridos interespecíficos entre *P. axillaris*, *P. exserta* e *P. secreta*. A hibridação é um processo comum na evolução deste grupo de plantas, possivelmente desempenhando um papel fundamental em seu sucesso evolutivo.

Mesmo com diversidade de polinizadores e características florais, vimos no capítulo 1 que os genes analisados recuperaram as relações filogenéticas refletindo o ancestral comum mais recente das espécies dentro de cada gênero. As sequências dos genes diferiram pouco entre as espécies de *Petunia*, levando-nos a acreditar que a regulação da expressão dos genes estivesse influenciando os traços florais característicos de cada síndrome floral. No capítulo 2, detectamos uma forte atuação do componente filogenético na distinção dos *cis*-elementos entre os clados de tubo longo e tubo curto. Revelamos um complexo mecanismo de sinalização de expressão que difere entre espécies de clados diferentes, que é capaz de determinar fenótipos convergentes atrativos a abelhas em *P. inflata* e *P. secreta*.

As interações entre os diferentes genomas das espécies canônicas nos híbridos e a presença de polimorfismos naturais nos indivíduos parentais promoveu elevada variabilidade na expressão dos genes analisados no capítulo 4. Embora eles sejam diferencialmente expressos entre indivíduos canônicos e híbridos, não explicam totalmente os fenótipos associados às síndromes de polinização encontradas no capítulo 3, mariposas noturnas para os híbridos com *P. axillaris*, principalmente abelhas para os híbridos entre *P. exserta* e *P. secreta*. Os três algoritmos utilizados na metodologia de modelagem por aprendizado de máquina empregados no capítulo 5 produziram resultados semelhantes ao encontrados no capítulo 3 utilizando diferentes metodologias para análise da morfologia floral dos híbridos.

Dados complementares são necessários para que enriqueçam nossa compreensão das síndromes florais nos híbridos naturais de *Petunia*. A análise em separado do aroma floral e do pólen pode oferecer resultados valiosos sobre como as mariposas noturnas são atraídas a longas distâncias, e como as abelhas diferenciam as espécies para coleta

de pólen. Enquanto a investigação da composição de açúcares e aminoácidos no néctar pode fornecer informações cruciais sobre as preferências alimentares dos polinizadores, indo além da simples consideração do volume e da concentração do néctar.

Referências Bibliográficas

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R et al. (2013) Hybridization and speciation. *J Evol Biol* 26:229–246.
- Albuquerque-Lima S, Domingos-Melo A, Nadia TCL, Bezerra ELS, Navarro DMAF, Milet-Pinheiro P e Machado IC (2020) An explosion of perfume: Mass flowering and sphingophily in the Caatinga dry region in Brazil. *Plant Species Biol* 35: 243–255.
- Amrad A, Moser M, Mandel T, De Vries M, Schuurink RC, Freitas L e Kuhlemeier C (2016) Gain and Loss of Floral Scent Production through Changes in Structural Genes during Pollinator-Mediated Speciation. *Curr Biol* 26:3303–3312.
- Ando T (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 88:403–413.
- Ando T, Iida S, Kokubun H, Ueda Y e Marchesi E (1995) Distribution of *Petunia axillaris* sensu lato in Uruguay as revealed by discriminant analysis of the live plants. *J Japanese Soc Hortic Sci* 64:381–391.
- Ashworth L, Aguilar R, Marten-Rodriguez S, Lopezaraiza-Mikel M, Avila-Sakar G, Rosas-Guerrero V e Quesada M (2015) Pollination syndromes: a global pattern of convergent evolution driven by the most effective pollinator. In: Pontarotti P, (ed) *Evolutionary biology. Biodiversification from genotype to phenotype*. Springer, Switzerland, pp 203–224
- Avila Jr RS, Oliveira R, Pinto CE, Amorim FW e Schlindwein C (2012) Relações entre Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) e Flores no Brasil – Panorama e Perspectivas de Uso de Polinizadores. In: Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL, Alves DA e Saraiva AM (Org). 1st edition. edUSP, São Paulo, pp143-152.
- Backes A, Turchetto C, Mäder G, Segatto ALA, Bonatto SL e Freitas LB (2024) Shades of white: The *Petunia* long corolla tube clade evolutionary history. *Genet Mol Biol* 47:e20230279.
- Bartkowska MP e Johnston MO (2012) Pollinators cause stronger selection than herbivores on floral traits in *Lobelia cardinalis* (Lobeliaceae). *New Phytol* 193:1039–1048.
- Berardi AE, Esfeld K, Jäggi L, Mandel T, Cannarozzi GM e Kuhlemeier C (2021) Complex evolution of novel red floral color in *Petunia*. *The Plant Cell* 33:2273–2295.
- Boersma MR, Patrick RM, Jillings SL, Shaipulah NFM, Sun P, Haring MA, Dudareva N, Li Y e Schuurink RC (2022) ODORANT1 targets multiple metabolic networks in petunia flowers. *The Plant Journal* 109:1134–1151.
- Bombarely A, Moser M, Amrad A, Bao M, Bapaume L, Barry CS, Bliet M, Boersma MR, Borghi L, Bruggmann R et al. (2016) Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature Plants* 2:16074.
- Caballero-Villalobos L, Silva-Arias GA, Turchetto C, Giudicelli GC, Petzold E, Bombarely A e Freitas LB (2021) Neutral and adaptive genomic variation in hybrid zones of two ecologically diverged *Petunia* species (Solanaceae). *Bot J Linn Soc* 196:100–122.
- Campbell DR, Faidiga A e Trujillo G (2018) Clines in traits compared over two decades in a plant hybrid zone. *Ann Bot* 122: 315–324.

- Caruso CM, Eisen KE, Martin RA and Sletvold N (2018) A meta-analysis of the agents of selection on floral traits. *Evolution* 73: 4–14.
- Castellanos MC, Wilson P e Thomson JD (2004) ‘Anti-bee’ and ‘pro-bird’ changes during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *J Evol Biol* 17: 876–885.
- Chen Z, Niu Y, Liu C-Q e Sun H (2020) Red flowers differ in shades between pollination systems and across continents. *Ann Bot* 126:837–848.
- Chopy M, Binaghi M, Cannarozzi G, Halitschke R, Boachon B, Heutink R, Bomzan DP, Jäggi L, Van Geest G, Verdonk JC et al. (2023) A single MYB transcription factor with multiple functions during flower development. *New Phytol* 239:2007–2025.
- Colquhoun TA, Kim JY, Wedde AE, Levin LA, Schmitt KC, Schuurink RC e Clark DG (2011) PhMYB4 fine-tunes the floral volatile signature of *Petunia × hybrida* through PhC4H. *J Exp Bot* 62:1133–1143.
- Dafni A, Kevan PG e Husband BC (2005) Practical pollination biology. 1st edition. Enviroquest Ltd, Cambridge. 590 pp.
- Dellinger AS (2020) Pollination syndromes in the 21st century: where do we stand and where may we go? *New Phytol* 228:1193–1213.
- Esfeld K, Berardi AE, Moser M, Bossolini E, Freitas L e Kuhlemeier C (2018) Pseudogenization and Resurrection of a Speciation Gene. *Curr Biol* 28:3776–3786.e7.
- Faegri K e van der Pijl L (1979) Animals as Pollinators. In: Faegri K and van der Pijl L, (eds) The principles of pollination ecology. 3rd edition. Pergamon Press, New York, pp. 96–133.
- Fenske MP, Hewett Hazelton KD, Hempton AK, Shim JS, Yamamoto BM, Riffell JA e Imaizumi T (2015) Circadian clock gene *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* directly regulates the timing of floral scent emission in *Petunia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:9775–9780.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR e Thomson JD (2004) Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annu Rev Ecol Evol* 35:375–403.
- Fleming TH, Geiselman C e Kress WJ (2009) The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Ann Bot* 104: 1017–1043.
- Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL e Freitas LB (2013) Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland: Species Diversification in the Pampas. *Bot J Linn Soc* 171:140–153.
- Galliot C, Hoballah ME, Kuhlemeier C e Stuurman J (2006) Genetics of flower size and nectar volume in *Petunia* pollination syndromes. *Planta* 225:203–212.
- Gélvez-Zúñiga I, Teixido AL, Neves ACO e Fernandes GW (2018) Floral antagonists counteract pollinator-mediated selection on attractiveness traits in the hummingbird-pollinated *Collaea cipoensis* (Fabaceae). *Biotropica* 50:797–804.
- Gervasi DDL e Schiestl FP (2017) Real-time divergent evolution in plants driven by pollinators. *Nat Commun* 8: 14691.
- Giudicelli GC, Turchetto C, Teixeira MC e Freitas LB (2019) Morphological and genetic characterization in putative hybrid zones of *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* and subsp. *parodii* (Solanaceae). *Bot J Linn* 191:353–364.

- Gleiser G, Internicola AI, Austerlitz F e Bernasconi G (2014) Stabilizing selection on nectar concentration in wild *Petunia axillaris*, as revealed by genetic analysis of pollen dispersal. *Evol Ecol* 28:869–884.
- Harder LD e Johnson SD (2009) Darwin’s beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytol* 183: 530–545.
- Hermann K, Klahre U, Venail J, Brandenburg A e Kuhlemeier C (2015) The genetics of reproductive organ morphology in two *Petunia* species with contrasting pollination syndromes. *Planta* 241:1241–1254.
- Hoballah ME, Gübitz T, Stuurman J, Broger L, Barone M, Mandel T, Dell’Olivo A, Arnold M e Kuhlemeier C (2007) Single gene-mediated shift in pollinator attraction in *Petunia*. *Plant Cell* 19:779–790.
- Johnson ET, Ryu S, Yi H, Shin B, Cheong H e Choi G (2001) Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *The Plant Journal* 25:325–333.
- Kay KM, Reeves PA, Olmstead RG e Schemske DW (2005) Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Costaceae): evidence from nrDNA ITS and ETS sequences. *AJB* 92:1899–1910.
- Klahre U, Gurba A, Hermann K, Saxenhofer M, Bossolini E, Guerin PM e Kuhlemeier C (2011) Pollinator choice in *Petunia* depends on two major genetic loci for floral scent production. *Curr Biol* 21:730–739.
- Kokubun H, Nakano M, Tsukamoto T, Watanabe H, Hashimoto G, Marchesi E, Bullrich L, Basualdo IL, Kao T e Ando T (2006) Distribution of self-compatible and self-incompatible populations of *Petunia axillaris* (Solanaceae) outside Uruguay. *J Plant Res* 119:419–430.
- Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM e Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol* 15: 4487–4497.
- Marques I, Jürgens A, Aguilar JF e Feliner GN (2016) Convergent recruitment of new pollinators is triggered by independent hybridization events in *Narcissus*. *New Phytol* 210:731–742.
- Milne RI, Abbott RJ, Wolff K e Chamberlain DF (1999) Hybridization among Sympatric Species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Turkey: Morphological and Molecular Evidence. *Am J Bot* 86:1776.
- Neto HFP (2013) Floral biology e breeding system of *Bauhinia forficata* (Leguminosae: Caesalpinioideae), a moth-pollinated tree in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 36: 55–64.
- Ollerton J, Killick A, Lamborn E, Watts S e Whiston M (2007) Multiple meanings and Modes: on the many ways to be a generalist flower. *Taxon* 56: 717–728.
- Oyama-Okubo N, Ando T, Watanabe N, Marchesi E, Uchida K e Nakayama M (2005) Emission mechanism of floral scent in *Petunia axillaris*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:773–777.
- Pezzi PH, Guzmán-Rodríguez S, Giudicelli GC, Turchetto C, Bombarely A e Freitas LB (2022) A convoluted tale of hybridization between two *Petunia* species from a transitional zone in South America. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 56:125688.

- Prance, GT (1985) The pollination of Amazonian plants. In: Prance GT and Lovejoy TE (eds) Key environments: Amazonia. 1st edition. Pergamon Press, New York, pp.166-191.
- Quattrocchio F, Wing J, Van Der Woude K, Souer E, De Vetten N, Mol J e Koes R (1999) Molecular Analysis of the *anthocyanin 2* Gene of *Petunia* and Its Role in the Evolution of Flower Color. *Plant Cell* 11:1433–1444.
- Reck-Kortmann M, Silva-Arias GA, Segatto ALA, Mäder G, Bonatto SL e Freitas LB (2014) Multilocus phylogeny reconstruction: New insights into the evolutionary history of the genus *Petunia*. *Mol Phylogenet Evol* 81:19–28.
- Rodrigues DM, Turchetto C, Callegari-Jacques SM e Freitas LB (2018) Can the reproductive system of a rare and narrowly endemic plant species explain its high genetic diversity? *Acta Bot Bras* 32:180–187.
- Rodrigues DM, Turchetto C, Lima JS e Freitas LB (2019) Diverse yet endangered: pollen dispersal and mating system reveal inbreeding in a narrow endemic plant. *Plant Ecol Divers* 12:169–180.
- Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaiza-Mikel M, Bastida JM e Quesada M (2014) A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecol Lett* 17: 388–400.
- Särkinen T, Bohs L, Olmstead RG e Knapp S (2013) A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): A dated 1000-tip tree. *BMC Evol Biol* 13:214.
- Schnitzler CK, Turchetto C, Teixeira MC e Freitas LB (2020) What could be the fate of secondary contact zones between closely related plant species? *Genet Mol Biol* 43:e20190271.
- Segatto ALA, Cazé ALR, Turchetto C, Klahre U, Kuhlemeier C, Bonatto SL e Freitas LB (2014) Nuclear and plastid markers reveal the persistence of genetic identity: A new perspective on the evolutionary history of *Petunia exserta*. *Mol Phylogenet Evol*
- Sheehan H, Hermann K e Kuhlemeier C (2012) Color and Scent: How Single Genes Influence Pollinator Attraction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 77:117–133.
- Solís-Montero L e Vallejo-Marín M (2017) Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism. *Ecol Evol* 7:2706–2715.
- Spitzer-Rimon B, Farhi M, Albo B, Cna'ani A, Ben Zvi MM, Masci T, Edelbaum O, Yu Y, Shklarman E, Ovadis M et al. (2013) The R2R3-MYB-Like Regulatory Factor EOBI, Acting Downstream of EOBI, Regulates Scent Production by Activating *ODO1* and Structural Scent-Related Genes in *Petunia*. *The Plant Cell* 24:5089–5105.
- Spitzer-Rimon B, Marhevka E, Barkai O, Marton I, Edelbaum O, Masci T, Prathapani N-K, Shklarman E, Ovadis M e Vainstein A (2010) *EOBII*, a Gene Encoding a Flower-Specific Regulator of Phenylpropanoid Volatiles' Biosynthesis in *Petunia*. *The Plant Cell* 22:1961–1976.
- Stehmann JR (1987) *Petunia exserta* (Solanaceae): uma nova espécie do Rio Grande do Sul, Brasil. *Napaea* 2:19–21.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de

- Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir. Campinas. pp 312.
- Stehmann JR e Semir J (2001) Biologia reprodutiva de *Calibrachoa elegans* (Miers) Stehmann & Semir (Solanaceae). Rev bras Bot, 24:43-49.
- Stehmann JR e Semir J (2005) Two new species of *Calibrachoa* (Solanaceae) from subtropical South America. Phytotaxa 25:31–38.
- Stehmann JR, Lorenz-Lemke AP, Freitas LB e Semir J (2009) The genus *Petunia*. In: Gerats T, Strommer J, eds. *Petunia* evolutionary, developmental and physiological genetics. Springer, New York, pp 1-28.
- Strauss SY, Whittall JB, Harder KD and Barrett SCH (2006) Non-pollinator agents of selection on floral traits. In: Harder LD and Barrett SCH (eds) *Ecol Evol of flowers*. Oxford University Press, Oxford, pp 120–138.
- Stuurman J, Hoballah ME, Broger L, Moore J, Basten C e Kuhlemeier C (2004) Dissection of floral pollination syndromes in *Petunia*. Genetics 168:1585–1599.
- Teixeira MC, Turchetto C, Hartke S, Schnitzler CK e Freitas LB (2019) Morphological and genetic perspectives of hybridization in two contact zones of closely related species of *Petunia* (Solanaceae) in southern Brazil. Acta Bot Bras 33:734–740.
- Teixeira MC, Turchetto C, Maestri R e Freitas LB (2020) Morphological characterization of sympatric and allopatric populations of *Petunia axillaris* and *P. exserta* (Solanaceae). Bot J Linn Soc 192:550–567.
- Turchetto C, Segatto ALA, Beduschi J, Bonatto SL e Freitas LB (2015) Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. AoB Plants 7:plv084.
- Turchetto C, Segatto ALA, Silva-Arias GA, Beduschi J, Kuhlemeier C, Bonatto SL e Freitas LB (2019) Contact zones and their consequences: hybridization between two ecologically isolated wild *Petunia* species. Bot J Linn Soc boz022.
- van der Niet TA and Johnson SD (2012) Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. TREE 27:353–361.
- van der Niet, T Peakall R e Johnson SD (2014) Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. Ann Bot 113: 199–211.
- Vandelook F, Janssens SB, Gijbels P, Fischer E, Van Den Ende W, Honnay O e Abrahamczyk S (2019) Nectar traits differ between pollination syndromes in Balsaminaceae. Ann Bot 124:269–279.
- Venail J, Dell’Olivo A e Kuhlemeier C (2010) Speciation genes in the genus *Petunia*. Philos Trans R Soc B Biol Sci 365:461–468.
- Verdonk JC, Haring MA, Van Tunen AJ e Schuurink RC (2005) *ODORANTI* Regulates Fragrance Biosynthesis in *Petunia* Flowers. The Plant Cell 17:1612–1624.
- Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM e Ollerton J (1996) Generalization in pollination systems, and why it matters. Ecology 77:1043–60.
- Wester P and Lunau K (2017) Plant–Pollinator Communication. In: *Advances in Botanical Research*. Elsevier, pp. 225–257.
- Whittall JB e Hodges SA (2007) Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. Nature 447:706–709.
- Willmer, P (2011) *Pollination and floral ecology*. 1st edition. Princeton University Press, New Jersey, pp. 1-832.

Wilson P, Wolfe AD, Armbruster WS e Thomson JD (2007) Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytol* 176: 883–890.