

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**INVESTIGANDO A VARIABILIDADE DOS SINAIS FLORAIS E A
DIVERSIFICAÇÃO DE *NICOTIANA SEÇÃO ALATAE***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Botânica**.

MARIA ALICE MACHADO DOS SANTOS COUTO

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Caroline Turchetto

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo L. G. Soares

Porto Alegre, novembro de 2022.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Evolução, Ecologia Química e Quimiotaxonomia (LEEQTAX), Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e Laboratório de Evolução Molecular (LEM), Departamento de Genética, UFRGS, e contou com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e do Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGBOT), UFRGS. A bolsa de mestrado foi concedida pela CAPES.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Diversidade floral e polinizadores	6
1.2. Grupo alvo do estudo.....	9
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. CAPÍTULO I	13
4. CAPÍTULO II	14
CONSIDERAÇÕES FINAIS	15
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

RESUMO

Os sinais florais, como odor, cor e forma, medeiam a complexa comunicação entre flor e polinizadores. Estas características, associadas aos sistemas de recompensa como néctar e pólen, são estratégias desenvolvidas por estes organismos sésseis para garantir a atração, visitação e retorno dos polinizadores e, desta forma, sua reprodução. Grupos funcionais de polinizadores, muitas vezes, são atraídos por sinais específicos, porém também podem associar a presença de recompensas a novas características, possibilitando o fluxo gênico entre espécies. O gênero *Nicotiana* é um modelo usado para o estudo das contribuições de eventos de hibridação como motor de diversificação, e suas flores de forma e cor variados estabelecem diversas relações com grupos de polinizadores diferentes. O Capítulo I deste trabalho se propôs a criar um banco de dados de sinais olfativos florais que esquematiza o conhecimento atual sobre compostos orgânicos voláteis, do inglês *volatile organic compounds (VOCs)* no gênero *Nicotiana*. Nós encontramos que, ao passo que as emissões diurnas e noturnas se mostram correlacionados com os sistemas de polinização das espécies, as relações filogenéticas também têm influência no fenótipo de espécies intimamente correlacionadas. Porém, ressaltamos que o conhecimento sobre VOCs florais em *Nicotiana* ainda é muito restrito a expressões genéticas inatas, que não espelham a realidade ecológica encontrada em ambientes naturais. No capítulo II realizamos um estudo de caso em uma população possivelmente híbrida de *Nicotiana alata* e *Nicotiana forgetiana* que confirma a necessidade de mais estudos que levem o peso das variações ambientais no estudo dos sinais florais do gênero. As espécies citadas estabelecem relações com diferentes polinizadores, porém a população natural encontrada além de performar características morfológicas e de coloração intermediárias entre os parentais, exibiu padrões de segregação de características na prole cultivada. Tomados em conjunto, os resultados da dissertação trazem informações relevantes para compreender os processos relacionados com a diversificação de espécies no gênero, bem como o papel dos polinizadores em dado processo.

Palavras-chave: Evolução, Hibridação, Morfologia floral, Odor floral, Interação planta-polinizador.

ABSTRACT

Floral signals, such as odor, color, and shape, mediate the complex communication between flowers and pollinators. These characteristics, associated with reward systems such as nectar and pollen, are strategies developed by these sessile organisms to ensure the attraction, visitation, and pollinator's constancy, thus, their effective reproduction. Specific floral signals often are related to some functional pollinator groups; however, these pollinators also can learn and associate not specific traits to the presence of rewards, thus enabling gene flow between species. The genus *Nicotiana* is a model used to study the contributions of hybridization events as a drive for species diversification, and its flowers vary in shape and color and establish different pollination relationships. Chapter I of this work proposed to create a floral olfactory signals database that outlines the current knowledge about floral volatile organic compounds (VOCs) for the genus. We found that while diurnal and nocturnal emissions are correlated with species pollination systems, phylogenetic relationships also influence the phenotype of closely correlated species. However, it was observed that knowledge about floral VOCs in *Nicotiana* is still very restricted to innate genetic expressions, which do not reflect the ecological reality of natural environments and intraspecific variation. In chapter II we conducted a case study in a hybrid population of *Nicotiana alata* and *Nicotiana forgetiana* confirming the need for more studies that consider environmental variations in the study of floral signals. The mentioned species establish relationships with different pollinators. However, the natural hybrid population displayed intermediate morphological and color characteristics between the parental species and exhibited patterns of segregation of characteristics in the cultivated offspring. Taken together, the results of this work provide relevant information to understand the processes related to the diversification of species in the genus.

Keywords: Evolution, Hybridization, Floral Morphology, Floral odor, Plant-pollinator Interaction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Diversidade floral e polinizadores*

Como organismos sésseis, plantas necessitam construir estratégias para garantir sua reprodução, facilitando a transferência direcionada de gametas. Uma das estratégias desenvolvidas ao longo do tempo foi a relação intrínseca entre flor e animais polinizadores, aproveitando os animais como intermediários na troca de gametas. Esses visitantes florais são pagos por seus serviços, geralmente por meio de néctar açucarado ou pólen excedente. As plantas anunciam essas recompensas com exibições vistosas para ajudar os polinizadores a encontrá-las (Faegri & Van Der Pijl, 1971; Chittka & Raine, 2006; Schiestl & Johnson, 2013). As diversas características florais como cor, odor, morfologia e características do néctar muitas vezes são o resultado da seleção natural para atrair e garantir o retorno do mesmo grupo de polinizadores, tornando sua reprodução mais eficiente (Shaefer, Shaefer & Laevey, 2004; Chittka & Thomson, 2001; Chittka & Raine, 2006).

A morfologia floral é regulada pelos genes do desenvolvimento, e entre eles o sistema de genes ABC, que controla o desenvolvimento e forma do tecido floral (Irish, 2017). A forma e tamanho dos órgãos florais influencia diretamente a percepção, disponibilidade física de recursos e plataforma de pouso para polinizadores (Silberbauer-Gottsberger *et al.*, 2003; Agosta & Janzen, 2005; Cronk & Ojeda, 2008). Desta forma, eventos genômicos podem influenciar o referido sistema ABC, como eventos de hibridação e duplicação completa genômica, modificando assim a forma com a qual a flor sinaliza para possíveis visitantes (Irish, 2017, Chase, Paun & Fay, 2010; Porturas *et al.*, 2019).

Cores e odores florais também tem papel importante como sinais para polinizadores (Goulson, 1999; Raguso & Willis, 2002). Os metabólitos secundários, como flavonoides, terpenos, derivados de ácido graxo e cetonas, entre outros fazem parte da árvore variada de compostos que fazem o intermédio da comunicação planta-polinizador (Maffei, 2010; Samanta, Das, & Das, 2001) (Fig. 1).

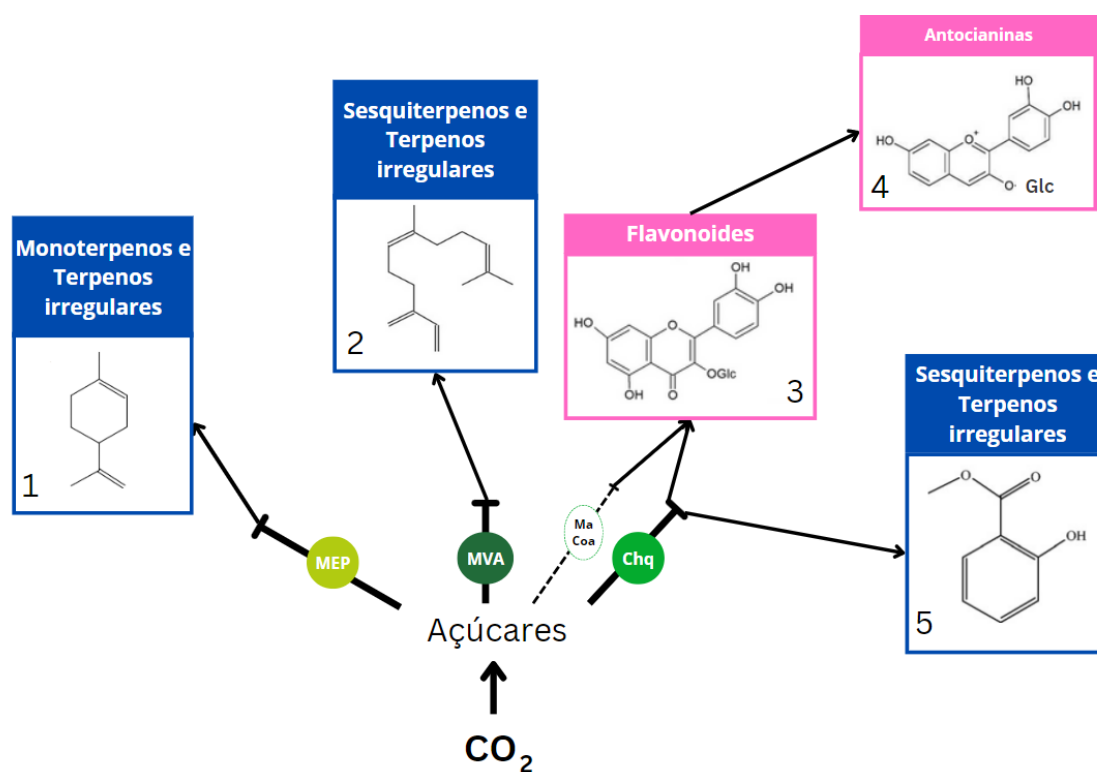


Figura 1: Rotas biossintéticas e compostos secundários. Nomes das rotas em círculos verdes, classes de pigmentos em caixas rosas e classes de VOCs em caixas azuis. MEP: rota do Metileritrol fosfato, MVA: rota do Mevanolato, MaCoa: rota do Malonyl-CoA, Chq: rota do Chiquimato. 1: Limoneno, 2: β-farneseno, 3: Quercitina, 4: Esqueleto estrutural de Antocianinas, 5: Metil Salicilato. (Maffei, 2010; Agati *et al.*, 2013; Wayuninsh *et al.*, 2016).

Os compostos orgânicos voláteis (do inglês VOCs) são uma mistura complexa de compostos secundários derivados de diferentes rotas biossintéticas (por exemplo, via metileritrol fosfato – MEP –, via do mevanolato – MVA –, via do chiquimato). Os VOCs se dividem em classes baseadas em sua rota de origem e estrutura química. São produzidos por diferentes tecidos e com diferentes funções, como resposta a estresse abiótico, alelopatia, herbivoria e atração de polinizadores (Maffei, 2010; Dudareva, Pichersky & Gerjenzon, 2004). Dentre os VOCs, derivados de ácido graxo, benzenóides e terpenóides são os mais comumente encontrados nos aromas de flores (Knudsen, Tollsten & Bergström, 1993), e se é possível traçar correlações entre presença de compostos específicos – ou classes específicas – e a atração de grupos de polinizadores (Lemaitre *et al.*, 2014). Flores polinizadas por mariposas noturnas, por exemplo, tem presença de sesquiterpenos oxigenados em sua emissão; em contrapartida essa classe é ausente em plantas que atraem mariposas pequenas, que são atraídas por linalol e seus isômeros (Knudsen & Tollsten, 1993; Dötterl, *et al.* 2006).

As cores vibrantes das flores são decorrentes da produção de pigmentos como carotenoides, betalaínas e, principalmente, antocianinas (Tanaka *et al.*, 2008). O último é um composto flavonoídico, sendo um pigmento presente em diversos tecidos vegetais, com cores que variam do rosa, vermelho, violeta e azul (Andersen *et al.*, 2010). Flores de tons avermelhados, que refletem luz em ondas de maior energia, tendem a chamar menos atenção de insetos como abelhas; que enxergam em ondas de menor energia; sendo assim essas flores são mais visitadas por beija-flores e outros pássaros, já que sua percepção de cor se estende até o vermelho (Altshuler, 2006; Herrera, Zagal & Diaz, 2008). Outra característica comum entre flores que são visitadas por pássaros, além de tons avermelhados, é a ausência de odor ou emissão de *blends* menos característicos. Os *bouquets* de compostos emitidos por flores polinizadas por beija-flores são simultaneamente emitidos por tecidos foliares também, e em muitas plantas tendem a ter função de defesa contra herbívoros e possível atração de polinizadores secundários em alguns casos (Cronk & Ojeda, 2008; Knudsen *et al.*, 2004).

Flores aparentemente brancas ao olho humano produzem pigmentos flavonoídicos de diferentes classes, como chalconas e flavonóis, exibindo padrões visíveis somente na faixa UV (Samanta, Das & Das, 2001; van der Kooi *et al.*, 2016). Flores brancas ou de cores fracas, consideradas “*dull colors*” que apresentem tais flavonóis tendem a ser atrativas para polinizadores que enxerguem nessas faixas de luz, como mariposas noturnas, abelhas, besouros etc. (Samanta, Das, & Das, 2001; Goyret *et al.*, 2008; McCarthy *et al.*, 2015). Essa atração, porém, acontece em sinergia com a emissão de compostos voláteis. Ligação tão característica que se estabeleceu um odor específico de flores brancas (*white flower scent*), rico em benzenóides e monoterpenos (Knudsen & Tollsten, 1993; Knudsen *et al.*, 1993; Raguso & Willis, 2002).

Os sinais florais podem ser usados para limitar o tipo de visitante (Schiestl & Schlüter, 2009; Hermann & Kuhlemeier, 2011), mas essa limitação normalmente não é absoluta (Waser *et al.*, 1996). Diferentes tipos de polinizadores podem apresentar diferentes habilidades de percepção (Briscoe & Chittka 2001; Chittka & Raine 2006; Kim *et al.*, 2011; Dell’Olivo & Kuhlemeier 2013). Por exemplo, pistas olfativas são importantes para mariposas (Mechaber *et al.*, 2002) que requerem grandes quantidades de néctar com baixa concentração de açúcar como recompensa (Kaczorowski *et al.*, 2005). Já as pistas visuais parecem ser importantes para as abelhas (Milet-Pinheiro *et al.*, 2012) que precisam de menores quantidades de néctar com alta concentração de açúcar (Baker & Baker, 1983). Essa interação planta-animal, ao longo do tempo, se demonstrou um importante fator de diversificação floral, agindo tanto como

isolamento genético, quanto como agente ativo de hibridação (Stebbins, 1970; Turchetto, Segatto & Turchetto-Zolet, 2022; Rezende *et al.*, 2019), impactando na evolução das plantas com flores (Chase & Fay, 2010; Niet & Johnson, 2012).

1.2. Grupo alvo do estudo

A família Solanaceae Juss. compreende um grupo botânico monofilético integrante da ordem Solanales (APG 4, 2017). Este clado começou a se diversificar aproximadamente 50-65 milhões de anos atrás, com seu centro de diversidade na América do Sul (Särkinen *et al.*, 2013; Dupin *et al.*, 2016). Dentro de Solanaceae, evoluíram diversas características florais que estabelecem relações com diferentes grupos funcionais de polinizadores. Polinização por aves surgiu de forma independente dez vezes, enquanto a polinização por mariposas surgiu oito vezes; incluindo em *Schizanthus* Ruiz & Pav., que é o clado mais basal. Ocorre também polinização por abelhas e insetos de forma generalizada, tendo em nota a dificuldade de estabelecer com precisão a síndrome de polinização de alguns insetos (Knapp, 2010).

A coloração floral vermelha é considerada rara, e dentro de Solanaceae elas representam apenas 1% do total de plantas, e seu surgimento na família é uma característica de evolução convergente em clados distantes filogeneticamente (Ng & Smith, 2016). Por outro lado, dentro do gênero *Nicotiana* seção *Alatae* (*Nicotiana* sect. *Alatae* Goodsp.), as emissões de voláteis é uma característica fenotípica que tem expressão parcialmente relacionada à filogenia (Raguso *et al.*, 2003).

O grupo citado acima, *Nicotiana* L., é o gênero da família Solanaceae de interesse do presente trabalho. Este clado tem sua provável origem e seu maior foco de diversidade na América do Sul, com eventos de dispersão dos Andes em direção a América do Norte e outra em direção ao Atlântico para Austrália e África (Goodspeed, 1954; Clarkson *et al.*, 2004). *Nicotiana* compreende mais de 90 espécies, subdivididas em 13 seções (Knapp, 2020). O gênero é usado como modelo de estudo de hibridação natural, uma vez que esse é um reconhecido motor de diversificação que gerou uma grande quantidade de espécies aloploidoides e homoploidoides de diferentes idades (Chase *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2010, 2013; Clarkson *et al.*, 2010, 2017; McCarthy *et al.*, 2015).

Dentro do gênero existe uma grande variedade de morfologia, cor e relação flor-polinizador: flores brancas, verdes, vermelhas; polinizadas por mariposas noturnas, abelhas e beija-flores (Ippolito *et al.*, 2004; Kaczorowski *et al.*, 2005, 2012; Marlin *et al.*, 2006, García

et al., 2020). Os eventos de hibridização dentro do gênero são estudados, correlacionando os efeitos de transgressão nos fenótipos que impactam diretamente nos sistemas de polinização estabelecidos (García *et al.*, 2020; McCarthy *et al.*, 2017, 2019).

A seção *Alatae* é uma linhagem de *Nicotiana* composta por nove espécies diploides ($n = 9$, $n = 10$) que ocorrem no Brasil e em outros países do Cone Sul (Clarkson *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2006, Knapp, 2020; Augsten *et al.*, 2022) (Fig. 2). Em especial, esse estudo foca nas espécies *N. alata* Link & Otto e *N. forgetiana* Hemsl., duas espécies apresentando características florais relacionadas com sistema especializado de polinização, e, de ocorrência em diferentes ambientes com poucas áreas de contato. A primeira ocorre do sul do Brasil até o sul do Paraguai, e a última é mais restrita a áreas no sul do Brasil na Floresta Atlântica (Teixeira *et al.*, 2022).

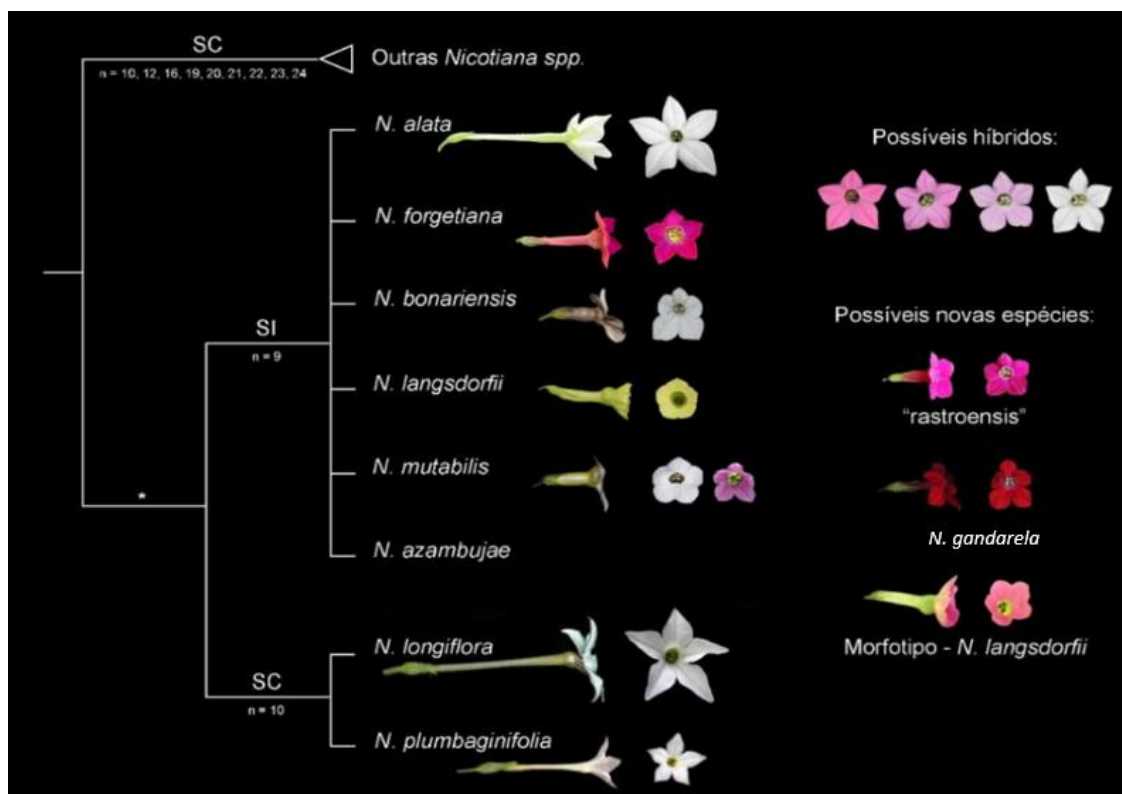


Figura 2: Representação esquemática das espécies da seção *Alatae*, com espécies novas e morfotipos. A seção se subdivide entre o grupo $n=9$, consistindo em *N. alata*, *N. forgetiana*, *N. bonariensis*, *N. langsdorfii*, *N. mutabilis* e *N. azambujae*; e o grupo $n=10$, *N. longiflora* e *N. plumbaginifolia*.

Como mencionado, as duas espécies filogeneticamente próximas mantêm sistemas de polinização diferentes. *N. alata* tem flores grandes, de tubo longo e brancas que exalam fortes

odores à noite no período em que é visitada por mariposas noturnas. Já as flores de *N. forgetiana*, polinizadas por beija-flores, são vermelhas e/ou rosadas, pequenas e exalam pouco odor, ainda que não sejam inteiramente sem cheiro (Ippolito *et al.*, 2004, Bissell & Diggle, 2008; Kaczarowski *et al.*, 2005; 2012; Raguso *et al.*, 2006). Estas duas espécies apresentam sistemas de polinização considerados especializados, porém há registros e descrições de visitantes florais de outros grupos funcionais (Ippolito *et al.*, 2004). A hibridização entre as espécies, apesar de experimentalmente possível, até recentemente não havia sido reportada (Ippolito *et al.*, 2004; Bissell & Diggle, 2008, 2010), sugerindo o isolamento reprodutivo entre elas. Porém, recentemente foram encontradas no Sul do Brasil populações de *N. alata* e *N. forgetiana* ocorrendo em simpatria com indivíduos exibindo características intermediárias que sugerem eventos naturais de hibridização (Teixeira *et al.*, 2022) (Fig. 3). Com este novo achado, ainda que as espécies tenham desenvolvido sistemas especializados de polinização, ainda há a possibilidade de que eventos de hibridização estejam envolvidos na evolução destas espécies.

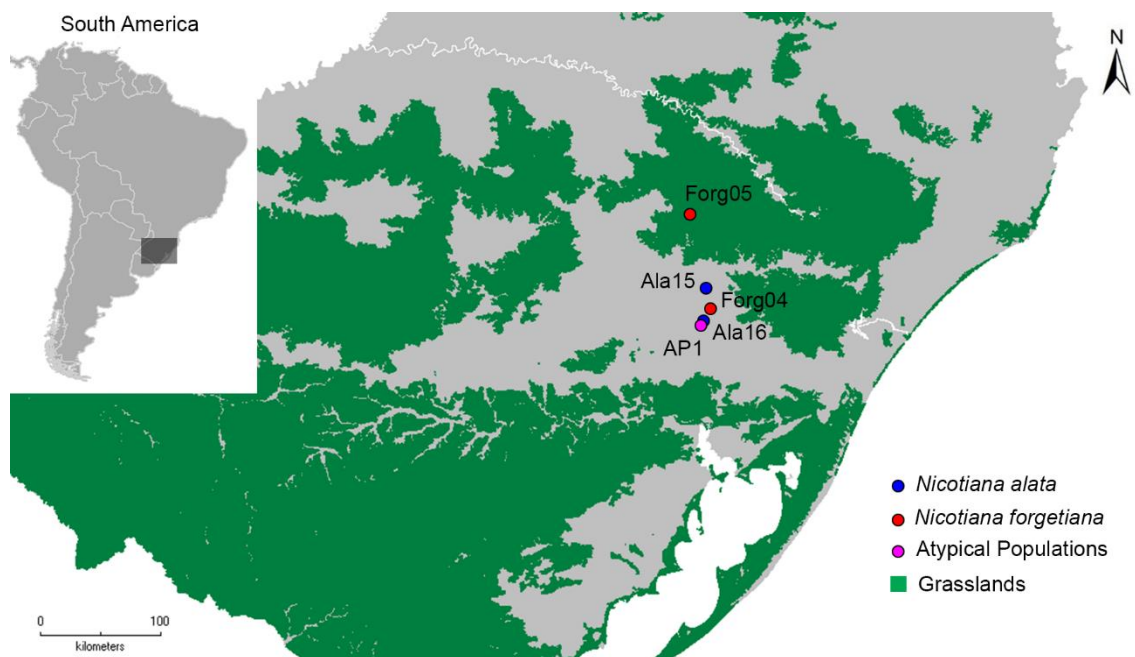


Figura 3: Localização geográfica das populações de *Nicotiana alata* (azul), *Nicotiana forgetiana* (vermelho) e da população atípica (roxo) no Sul do Brasil. A porção verde representa as áreas do bioma dos Pampas e em cinza está representado as áreas de Floresta Atlântica. As delimitações dos Pampas são feitas de acordo com Overbeck *et al.* (2007)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar os sinais florais aos polinizadores para discutir os mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação de *Nicotiana* sect. *Alatae*.

2.2. Objetivos específicos

- Criar uma base de dados de voláteis florais emitidos pelo gênero *Nicotiana*;
- Sistematizar as diferenças nas emissões diurnas e noturnas de compostos voláteis florais em *Nicotiana*;
- Investigar a relação entre os compostos voláteis com polinizadores, com foco na seção *Alatae*;
- Investigar a variação dos sinais florais em populações simpátricas e alopátricas de *N. forgetiana* e *N. alata* e sua relação com polinizadores;

3. CAPÍTULO I

EXPLORING CHEMICAL DIVERSITY OF FLORAL SCENT IN WILD TABACCO IN LIGHT OF EVOLUTION

Maria Alice M.S. Couto^{1,*}, Geraldo L. Soares¹, Caroline Turchetto^{1,2*}

Artigo em preparação a ser submetido para *Annals of Botany*

4. CAPÍTULO II

Floral signals variation in a putative hybrid zone between specialist pollination systems: How could it impact pollinator attraction?

MARIA ALICE M.S. COUTO^{1,*}, MARCELO C. TEIXEIRA², ALEXIA GOPE², ALICE BACKES², GERALDO L.G. SOARES¹, CAROLINE TURCHETTO^{1,2*}

Artigo submetido para *Botanical Journal of the Linnean Society*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sinais florais que medeiam a comunicação planta-polinizador são de natureza multifatorial e simultânea e, por esta razão, são percebidos e selecionados em associação pelo polinizador (Raguso & Willis, 2002). A variação e/ou alteração da expressão de algum destes componentes interfere no sistema comunicacional, podendo dificultar a efetivação da polinização e até causar na mudança de grupo funcional de polinizadores. Dentro do gênero *Nicotiana*, eventos de hibridação foram recorrentes ao longo da sua diversificação (Chase *et al.*, 2003), e fenômenos de hibridação são fatores que estimulam e facilitam eventos de mudança nos sistemas de polinização (Rezende *et al.*, 2019). Pelas razões elencadas, esta dissertação se propôs a aprofundar o estado atual de conhecimento sobre a emissão de compostos voláteis florais no gênero, e um estudo de um caso de sinais florais em duas espécies que apresentam especialização floral com grupos funcionais de polinizadores e sua população de possíveis híbridos naturais para melhor compreender a expressão dos sinais morfológicos e de pigmentação.

No Capítulo I da presente Dissertação esquematizamos a diversidade química dos VOCs florais emitidos pelo gênero *Nicotiana* e exploramos sua relação com a evolução do gênero, investigando a relação com a filogenia e grupos funcionais de polinizadores. Com apenas 19 das cerca de 90 espécies de *Nicotiana* (Knapp, 2020) com pesquisas em voláteis florais, no momento nos encontramos com uma sub-representação de estudos na área. Inclusive destacamos a falta de estudos sobre VOCs florais em seções completas, como *Noctiflorae*. Como um gênero composto por aloploiploides e homoploides híbridos (Clarkson *et al.*, 2010), é sintomática a constatação da falta de informação de emissão volátil floral na seção *Suaveolentes*, uma vez que esta é totalmente composta por aloploiploides (Knapp, 2020). McCarthy *et al.* (2017) evidencia o efeito de fenótipos transgressivos de cor floral em espécies aloploiploides próximas, e seus efeitos na emissão de aromas ainda necessitam de estudo.

Em seguida, no Capítulo II, investigamos como os caracteres relacionados aos sinais florais de morfologia e cor são expressos e variam entre populações canônicas e alopátricas de *N. forgetiana* e *N. alata* e uma população simpátrica possivelmente híbrida. Os acessos alopátricos demonstraram caracteres condizentes com os sinais florais de cada sistema de polinização. Os acessos simpátricos, por outro lado, exibem tanto características intermediárias quanto canônicas, que somadas ao padrão de segregação de características observadas sugerem a natureza híbrida dos indivíduos.

Na base de dados dos voláteis florais criada demonstramos que o perfil total de VOCs de *Nicotiana* está em par com as emissões mais comuns entre as angiospermas, com Terpenoides e Benzenóides como classes mais presentes e diversas (Knudsen *et al.*, 1993). A contabilização do perfil de emissões gerais separadas pelo ritmo circadiano segue a mesma tendência para emissões diurnas e noturnas para a maioria dos compostos. As maiores diferenças entre Dia x Noite, no entanto, se pronunciam nas análises dos perfis de emissão circadiana das espécies agrupadas por seus respectivos sistemas de polinização. As flores esfingófilas e falenófilas, os sistemas de mariposas noturnas e pequenas mariposas, respectivamente, tem seu *bouquet* floral similar e rico em linalol, álcool benzílico e 2-fenil álcool, e com mais variedade de VOCs nas emissões noturnas. Porém, também como é esperado pela literatura, apenas flores esfingófilas emitem sesquiterpenos oxigenados (Raguso & Willis, 2002; Knudsen & Tollsten, 1993; Kaiser, 1993). Destacamos que apesar de *N. otophora* ter relatos confirmados de visitação de morcegos e mariposas noturnas, esta espécie não possui nenhuma emissão de voláteis comumente associados a estes sistemas, como compostos sulfonados e sesquiterpenos oxigenados (Nattero *et al.*, 2003, von Helverson *et al.*, 2000, Knudsen & Tollsten, 1993). Apesar da amostragem de estudos realizados com esta referida espécie ser baixa, levanta-se a questão da lacuna de conhecimento sobre o sistema de polinização e seus sinais atrativos e efetivos.

Flores polinizadas por beija-flores foram similares em relação à emissão de VOCs florais. Apesar da ornitofilia não ser caracterizada por voláteis variados e especializados, outras relações ecológicas como a deterrência de herbívoros e outros visitantes florais também influenciam o perfil das emissões dos VOCs (Knudsen *et al.*, 2004; Cronk & Ojeda, 2008). Não apenas estas, mas relações filogenéticas também podem estar relacionadas à similaridade de emissão entre flores da seção *Alatae*. Os perfis de VOCs florais desta seção apresentam alta similaridade em diversidade de compostos e seus períodos de emissão. Por exemplo, as emissões diurnas são mais generalistas e similares entre as espécies, independente do sistema de polinização da flor (Raguso *et al.*, 2006). Flores de *N. alata* e *N. forgetiana*, que são o foco de estudo do Capítulo II, tem emissões diurnas similares, ainda que sejam polinizadas por grupos funcionais diferentes, mariposas noturnas e beija-flores, respectivamente (Kaczorowski *et al.*, 2005).

A uniformidade de emissões diurnas entre *Nicotiana alata* e *N. forgetiana* mencionada anteriormente é condizente com a proximidade filogenética destas espécies,

o que sugere que emissões florais também são regidas por relações filogenéticas (Raguso *et al.*, 2003; Clarkson *et al.*, 2017). Esta confluência dos mesmos sinais florais olfativos no mesmo período circadiano vai de encontro direto com a hipótese de que os visitantes secundários observados para as espécies – abelhas (Turchetto *et al.*, 2022) – transitem entre as duas espécies e, eventualmente, ajam como vetores de fluxo gênico entre elas. A viabilidade da hibridação experimental entre as espécies é conhecida (Ippolito *et al.*, 2004; Bissel & Diggle, 2008; 2010), ainda que nenhuma população híbrida natural tenha sido encontrada até o relato de populações atípicas ter sido feito por Teixeira *et al.* (2022). As espécies estabelecem sistemas de polinização bem definidos, porém as abelhas são agentes polinizadores eficientes que desenvolvem mecanismos cognitivos de aprendizagem que correlacionam sinais florais com recompensas (Chitka & Raine, 2006; Arenas & Farina, 2001). Além da confluência de sinais olfativos no período de atividade de abelhas, as flores de *N. alata* e *N. forgetiana*, assim como os possíveis híbridos, apresentam perfis de pigmentos com padrões perceptíveis a estes animais. Destacamos que as flores brancas e UV-não reflexivas de *N. alata*, de possíveis híbridos se encaixam no padrão de preferência de abelhas reportado por Lunau *et al.* (2011), o que demonstra que o sistema de polinização destas espécies ainda pode reservar novas fronteiras a serem abordadas.

Como mencionado no parágrafo anterior, híbridos entre *Nicotiana alata* e *N. forgetiana* são produzidos experimentalmente. Os fenótipos observados em campo por Teixeira *et al.* (2022) e os descendentes destes germinados para este estudo seguem os mesmos padrões intermediários e similares aos parentais que os produzidos por Bissel & Diggle (2008; 2010). Fenótipos de cor intermediária (totalmente rosa claro ou flores brancas com acúmulo de pigmento em áreas da pétala), porém, são similares em caracteres morfológicos à *N. alata*, não podendo ser discernidos em relação a elas levando apenas a arquitetura da corola em consideração. Ao germinar sementes de tais fenótipos intermediários, parte de seus descendentes foram indistinguíveis de *N. alata* e de *N. forgetiana* tanto na forma quanto na cor. Este resultado levanta a questão a serem investigadas como a extensão do impacto da hibridação, com eventos de introgressão em populações com morfologias consideradas canônicas. Ressaltamos também a possibilidade de retrocruzamento, pois experimentos com híbridos artificiais destas espécies mostram que em situações de simpatria, a presença dos fenótipos intermediários causa a baixa na seletividade dos polinizadores pelos sinais florais típicos dos parentais

(Ippolito *et al.*, 2004). A baixa seletividade pode, inclusive, ter causa correlacionada com a emissão de voláteis na área, pois como a percepção dos sinais florais são multimodais, a mariposa noturna pode visitar e iniciar a alimentação de flores não-odorantes caso no ambiente tenha outras flores emitindo voláteis atrativos e criando a referida “nuvem de odor” (do inglês, “*scent cloud*”) (Raguso & Willis, 2002; 2005).

Emissão de VOC é um sinal floral que também é intrinsecamente relacionado a pressões ambientais: herbivoria, condições climáticas e de solo, por exemplo (Maffei, 2010). A revisão feita no Capítulo I demonstrou que não houve estudos de emissões de VOCs florais *in situ*, que levassem em conta o impacto das demais relações ecológicas e pressões abióticas nas emissões. Estudos anteriores já demonstraram o impacto da herbivoria em folhas de *N. attenuata* na emissão de compostos importantes na atração de seu polinizador. Com a queda de emissão de benzil acetona e declínio na visitação da mariposa noturna, flores de indivíduos atacados permanecem abertas até o período do dia, se tornando assim disponíveis para visitação de outros animais (Kessler, Diezel & Baldwin, 2010). A expressão de características genéticas do aroma da maioria das espécies estudadas foi bem estabelecida; porém se faz necessário entender como o peso multifatorial das relações ecológicas age sobre sinais florais olfativos, e como eles podem ser determinantes na diversificação do gênero. A mesma abordagem ecológica se faz necessária com os eventos populacionais apresentados no Capítulo II, para a melhor compreensão das interações planta-polinizador das espécies em questão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agati, G, Brunetti, B, Di Fernandino, M, Ferrini, F, Tattini, M 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant physiology and Biochemistry*, 72: 35-45.
- Agosta, S J, & Janzen, D H 2005. Body size distributions of large Costa Rican dry forest moths and the underlying relationship between plant and pollinator morphology. *Oikos*, 108:183–193.
- Altshuler, LD 2006. Flower Color, Hummingbird Pollination and Habitat Irradiation irradiance in four neotropical forests. *Biotropica* 35: 344-355.

- Andersen OM, Jordheim M 2010. Chemistry of flavonoid-based colors in plants. In: L Mander, H-W Liu. eds. *Comprehensive natural products II: chemistry and biology*. Oxford: Elsevier, 547–614.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group), Stevens, P F. 2001 onwards. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since], acessado em Julho de 2020.
- Arenas, A, Farina, WM 2001. Learned olfactory cues affect pollen-foraging preferences in honeybees, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour* 83:1023-1033.
- Augsten, M, Meyer, PB, Freitas, LB, Batista, JAN, Stehmann, JR, 2022. *Nicotiana gandarela* (Solanaceae), a new species of ‘tobacco’ highly endangered from the Quadrilátero Ferrífero in Brazil. *PhytoKeys*, 190:113-129.
- Baker HG, Baker I. 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones CE, Little RJ (eds) *Handbook of experimental pollination biology*. Scientific and Academic Editions, New York, pp 117–141.
- Bissell EK, Diggle PK 2008. Floral morphology in *Nicotiana*: architectural and temporal effects on phenotypic integration. *International Journal of Plant Sciences* 169: 225–240.
- Bissell, EK, Diggle PK 2010. Modular genetic architecture of floral morphology in *Nicotiana*: quantitative genetic and comparative phenotypic approaches to floral integration. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1744–1758.
- Briscoe AD, Chittka L. 2001. The evolution of color vision in insects. *Annu Rev Entomol* 46:471–510.
- Chase MW, Knapp S, Cox AV, Clarkson JJ, Butsko Y, Joseph J, Savolainen V, Parokony AS 2003. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany* 92: 107–127.
- Chase, MW, Paun, O, Fay, MF 2010. Hybridization and speciation in angiosperms: a role for pollinator shifts? *Journal of Biology*, 9:18.
- Chittka, L, Thomson, J 2001. Behavioral responses of pollinators to variation in floral display size and their influences on the evolution of floral traits. *Cognitive ecology of pollination*, 274-296.
- Chittka, L, Raine, NE 2006. Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology*. 9:428-435.

- Clarkson JJ, Knapp S, Garcia VF, Olmstead RG, Leitch AR, Chase MW. 2004. Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33:75–90.
- Clarkson JJ, Kelly LJ, Leitch AR, Knapp S, Chase MW 2010. Nuclear glutamine synthetase evolution in *Nicotiana*: phylogenetics and the origins of allotetraploid and homoploid (diploid) hybrids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 99–112.
- Clarkson JJ, Dodsworth S, Chase MW 2017. Time calibrated phylogenetic trees establish a lag between polyploidization and diversification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 303: 1001–1012.
- Cronk, Q, Ojeda, I 2008 Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59:715–727.
- Dell’Olivo A, Kuhlemeier C. 2013. Asymmetric effects of loss and gain of a floral trait on pollinator preference. *Evolution* 67:3023–3031.
- Dötterl S, Jürgens A, Seifert K, Laube T, Weissbecker B & Schutz S. 2006. Nursery pollination by a moth in *Silene latifolia*: the role of odours in eliciting antennal and behavioural responses. *New Phytologist* 169:707–718.
- Dupin J, Matzke NJ, Särkinen T, Knapp S, Olmstead RG, Bohs L, Smith SD. 2016. Bayesian estimation of the global biogeographical history of the Solanaceae. *Journal of Biogeography*. 44:887-899.
- Faegri K, Van der Pijl L 1971. *The Principles of Pollination Ecology*. Oxford, Pergamon Press.
- García, M, Benítez-Vieyra, S, Sércic, A N, Pauw, A, Cocucci, A A, Travaset, A, Sazatornil, F, Paiaro, V. 2020. Is variation in flower and length among native and non-native populations of *Nicotiana glauca* a product of pollinator-mediation selection? *Evo. Ecol.* 34: 893-913.
- Goulson, D 1999. Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and implications for plant ecology and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2:185-209.
- Hermann K, Kuhlemeier C: The genetic architecture of natural variation in flower morphology. 2011. *Curr Opin Plant Biol.* 14:60-65.
- Herrera G, Zagal JC, Diaz M, et al. 2008. Spectral sensitivities of photoreceptors and their role in colour discrimination in the green-backed firecrown hummingbird (*Sephanooides sephanooides*). *Journal of Comparative Physiology, A Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 194: 785–794.

- Irish, V. 2017. The ABC model of floral development. *Current Biology*, 27: R887-R890.
- Ippolito, A Fernandes GW Holtsford, TP. 2004. Pollinator preference for *Nicotiana alata*, *N. forgetiana* and their F1 hybrids. *Evolution*, 58:2634–2644.
- Goyret, J, Pfaff, M, Raguso, RA, Kelber, A 2008. Why do *Manduca sexta* feed from white flowers? Innate and learnt colour preferences in a hawkmoth. *Naturwissenschaften* 95:569–576.
- Kaczorowski RL, Gardener, MC, Holtsford, TP.2005. Nectar traits in *Nicotiana* section *Alatae* (Solanaceae) in relation to floral traits, pollinators and mating systems. *American Journal of Botany* 92: 1270-1283.
- Kaczorowski, R L, Seliger, A R, Gaskett, A, C, Wigsten, SK, Raguso, RA. 2012. Corolla shape vs. size in flowers choicee by a nocturnal hawkmoth pollinator. *Functional Ecology*, 26:577-587.
- Kelly LJ, Leitch AR, Clarkson JJ, Hunter RB, Knapp S, Chase MW 2010. Intra-genic recombination events and evidence for hybrid speciation in *Nicotiana* (Solanaceae). *Molecular Biology and Evolution* 27: 781–799.
- Kelly LJ, Leitch AR, Clarkson JJ, Hunter RB, Knapp S, Chase MW 2013. Reconstructing the complex evolutionary origin of wild allopolyploid tobaccos (*Nicotiana* section *Suaveolentes*). *Evolution* 67: 80–94.
- Kessler D, Diezel C, Baldwin IT 2010. Changing pollinators as a means of escaping herbivores. *Current Biology* 20: 237–242.
- Kim W, Gilet T, Bush JWM. 2011. Optimal concentrations in nectar feeding. *Proc Natl Acad Sci* 4:16618–16621.
- Knapp, S 2010. On ‘various contrivances’: pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 365:449–460.
- Knapp S 2020. Biodiversity of *Nicotiana* (Solanaceae). In: Ivanov NV, Sierro N, Peitsch MC, eds. *The tobacco plant genome. Compendium of plant genomes*. Cham: Springer, 21–41.
- Knudsen, JT Tollsten, L. 1993. Trends in Floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth pollinated taxa. *Botanical Journal of Linnean Society*, 113:263:284.
- Knudsen, JT, Tollsten, L, Bergström, G. 1993. Floral Scents: a checklist of volatile compounds isolated by headspace techniques. *Phytochemistry*, 33: 253:280.

- Knudsen, JT, Tollsten, L, Groth, I, Bergström, G, Raguso, RA 2004. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in hummingbird-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 146:191–199.
- Lim, KY, Kovarik A, Matyasek R, Chase MW, Knapp S, McCarthy E, Clarkson JJ, Leitch AR 2006. Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae*. *The Plant Journal* 48: 907–919.
- Marlin, D, Nicolson, SW, Sampson, JDS, & Krüger, K. 2016. Insights into the pollination requirements of the only African wild tobacco, *Nicotiana africana* (Solanaceae) from the Namib Desert. *Journal of the Arid Environments*, 125: 64-67.
- McCarthy EW, Arnold SE, Chittka L, Le Comber SC, Verity R, Dodsworth S, Knapp S, Kelly LJ, Chase MW, Baldwin IT, Kovarik A, Mhiri C, Taylor L, Leitch AR 2015. The effect of polyploidy and hybridization on the evolution of floral colour in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany* 115: 17–1131.
- McCarthy EW, Berardi AE, Smith SD, Litt A 2017. Related allopolyploids display distinct floral pigment profiles and transgressive pigments. *American Journal of Botany*. 104: 92-101.
- McCarthy EW, Landis JB, Kurti A, Lawhorn AJ, Chase MW, Knapp S, et al.. 2019. Early consequences of allopolyploidy alter floral evolution in *Nicotiana* (Solanaceae). *BMC Plant Biology*. 19:162.
- Maffei, ME 2010. Sites of synthesis, biochemistry, and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* 76:612–631.
- Mechaber WL, Capaldo CT, Hildebrand JG. 2002. Behavioural responses of adult female tobacco hornworms, *Manduca sexta*, to hostplant volatiles change with age and mating status. *J Insect Sci* 2:5 (insectscience.org/2.5).
- Milet-Pinheiro P, Ayasse M, Schlindwein C, Dobson HEM, Dötterle S. 2012. Host location by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee: innate and learned behavior. *Behav Ecol* 23:531–538.
- Ng, J, Smith, SD 2016. How to make a red flower: the combinatorial effect of pigments. *AoB PLANTS*. 8: plw013.
- Overbeck GE, Müller SC, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar VD, Blanco CC, Boldrini II, Both R, Forneck ED. 2007. Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology. Evolution and Systematics* 9: 101-116

- Raguso, RA, Willis, M 2002. Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by naive hawkmoths, *Manduca sexta* ANIMAL BEHAVIOUR, 64: 685–695.
- Raguso, RA, Willis, M 2005. Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by wild hawkmoths, *Manduca sexta* ANIMAL BEHAVIOUR 69:407–418.
- Raguso RA, Levin RA, Foose SE, Holmberg MW, Mcdade LA 2003. Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination 'syndromes' in *Nicotiana* Phytochemistry 63: 265–284
- Raguso, RA, Schlumpberger, BO, Kaczorowski, RL, Holtsford, TP 2006. Phylogenetic fragrance patterns in *Nicotiana* sections *Alatae* and *Suaveolentes*. Phytochemistry, 67: 1931-1942.
- Rezende, L, Suzigan, J, Amorin, FW, Moraes, AP Can plant hybridization and polyploidy lead to pollinator shift? Acta Botanica Brasilica, 34:229-242.
- Samanta, A, Das, G, Das, SK 2011. Roles of Flavonoids in Plants. Int J Pharm Schi Tech, 6:1
- Särkinen T, Bohs L, Olmstead RG, Knapp S. 2013. A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. BMC Evolutionary Biology. 13: 214.
- Schaefer, HM, Schaefer, V, Laevey, D 2004. How Plant-animal interactions signal new insights in communication. Trends in Ecology and Evolution. 19: 577-584.
- Schiestl FP, Schlüter PM: Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids. Annu Rev Entomol. 2009, 54: 425-446.
- Schiestl FP, Johnson SD: Pollinator-mediated evolution of floral signals. Trends Ecol Evolution. 2013, 28: 307-315. 10.1016/j.tree.2013.01.019.
- Silberbauer-Gottsberger, I, Gottsberger, G, Webber, AC, 2003. Morphological and functional flower characteristics of New and Old World Annonaceae with respect to their mode of pollination. Taxon, 52: 701-718.
- Stebbins GL 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I: pollination mechanisms. Annual Review in Ecology Systematics 1: 307–326.
- Tanaka, Y., Sasaki, N, Ohmiya, A, 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal. 54: 733-749.
- Teixeira, MC, Quintana, IV, Segatto, ALA, Maestri, R, Freitas, LB, Augsten, M, Stehmann, JR, Turchetto, C, 2022. Changes in floral shape: insights into the Evolution of wild *Nicotiana* (Solanaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 199: 267-285.

- Turchetto C, Segatto ALA, Turchetto-Zolet A 2022. Biotic and abiotic factors in promoting the starting point of hybridization in the Neotropical flora: implications for conservation in a changing world. *200*:285-302.
- Van der Niet, T, & Johnson, S. D. 2012. Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution*, *27*:353–361.
- van der Kooij CJ, Elzenga JTM, Staal M, Stavenga DG 2016 How to colour a flower: on the optical principles of flower coloration. *Proc. R Soc. B* *283*: 20160429.
- Wahyuningsih, S, Wulandari, L, Wartono, MW, Munawaroh, H, Ramelan, AH 2017. The Effect of pH and Color Stability of Anthocyanin on Food Colorant. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* *193*:012047.
- Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J: Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*. 1996, *77*.