



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - INBIO
Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)

LORENA SARTORI MITIDIERI

**Anatomia floral comparada e fruit set da espécie ginodioica *Ocotea minarum*
(Lauraceae)**

Campo Grande - MS
2024

Lorena Sartori Mitidieri

**Anatomia floral comparada e *fruit set* da espécie ginodioica *Ocotea minarum*
(Lauraceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para obtenção de título de Bacharel
em Ciências Biológicas pela Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul - UFMS.
Orientador: Flávio Macedo Alves

Campo Grande - MS
2024

Agradecimentos

Dedico este trabalho aos meus pais, Ângela Lúcia Bagnatori Sartori e Luis Henrique Mitidieri, por todo o amor, carinho, apoio e incentivo incondicional para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Vocês são, e sempre serão, as minhas maiores inspirações. Agradeço também a minha avó, Ivone Bagnatori Sartori, por todas as orações que fez por mim e que tenho certeza que continua fazendo mesmo estando longe.

Agradeço imensamente às minhas amigas Camila Talgatti Terra, Larissa França dos Santos, Larissa Espindola, Giovanna Baeta, Juliana Olazar e muitas outras que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me ajudando sempre que precisei.

Também dedico este trabalho ao meu orientador, Flávio Macedo Alves, e a professora Flávia Maria Leme cuja confiança e apoio foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa. Sou extremamente grata pelos ensinamentos que me transmitiram e pela oportunidade que me proporcionaram em trabalhar em uma área pela qual, hoje, tenho imenso carinho. Obrigada por todo incentivo e orientação ao longo desse percurso.

Sumário

1. Introdução.....	6
2. Objetivos.....	6
2.1 Objetivos Gerais.....	6
2.2 Objetivos Específicos.....	6
3. Material e métodos.....	8
4. Resultados.....	10
5. Discussão.....	22
6. Conclusão.....	28
7. Referências Bibliográficas.....	29

Anatomia floral comparada e fruit set da espécie ginodioica *Ocotea minarum* (Lauraceae)

Lorena Sartori Mitidieri¹, Flávia Maria Leme¹ & Flávio Macedo Alves^{1,2}

Abstract

Ocotea minarum (Lauraceae) is a gynodioecious species. Gynodioecy is a dimorphic reproductive system where plants with pistillate and perfect flowers coexist within the same population. Comparative floral anatomy studies provide insights into the origin, identity and homology of floral structures, playing a crucial role in systematics and the evolution of reproductive systems in Lauraceae. To understand the evolution of gynodioecy in *Ocotea*, we conducted a comparative floral anatomy study combined with morphological characters and fruit set data from perfect and pistillate flowers of *Ocotea minarum*. The collected material was stored in alcoholic fixative, selected and dehydrated in an alcohol series to be embedded in historesin, sectioned and stained. For the fruit set data, flowering and fruiting periods were monitored throughout the year, and branches from certain individuals were selected to count flowers and fruits. Hermaphrodite flowers are larger, with five vascular bundles in the tepals, one bundle in the stamens and three bundles in the pistil. Pistillate flowers are smaller, with three to five vascular bundles in the tepals, one bundle in the stamens and three bundles in the pistil. Histochemical tests for lipids, starch and polysaccharides were negative in the epidermis and parenchyma of the glands in both floral morphotypes, indicating that these structures do not produce nectar. Individuals with pistillate flowers produced up to thirty more fruits than individuals with hermaphrodite flowers. This suggests a resource optimization strategy, where pistillate flowers invest in ovule and ovary quality to produce many seeds and fruits, while perfect flowers focus on pollen production. Our results suggest that gynodioecy represents an intermediate evolutionary stage between cosexuality and dioecy.

Key words: floral evolution, floral vascularization, histochemistry, nectaries, perianth.

Resumo

Ocotea minarum (Lauraceae) é uma espécie ginodioica. A ginodioicia é um sistema reprodutivo dimórfico onde plantas com flores pistiladas e perfeitas coexistem dentro da mesma população. Estudos de anatomia floral comparada fornecem dados sobre a origem, identidade e homologia das estruturas florais, desempenhando um papel fundamental na sistemática e na evolução do sistema reprodutivo em Lauraceae. Para entender a evolução da ginodioicia em *Ocotea*, realizamos um estudo de anatomia floral comparada associado aos caracteres da morfologia externa e dados de *fruit set* em flores perfeitas e pistiladas de *Ocotea minarum*. O material coletado foi armazenado em fixador alcoólico, selecionado e desidratado em série alcoólica para ser emblocado em historesina, cortado e corado. Para os dados de *fruit set*, os períodos de floração e frutificação foram acompanhados ao longo do ano e selecionados ramos de alguns indivíduos para a realização da contagem de flores e frutos. Os resultados mostraram que as flores perfeitas são maiores, apresentam cinco feixes vasculares nas tépalas, um feixe nos estames e três feixes no pistilo. As flores pistiladas são menores, apresentam de três a cinco feixes vasculares nas tépalas, um feixe nos estames e três feixes no pistilo. Os testes histoquímicos para lipídios, amido e polissacarídeos foram negativos na epiderme e no parênquima das glândulas dos dois morfotipos florais, indicando que esta estrutura não atua na produção de néctar. No *fruit set*, os indivíduos com flores pistiladas chegaram a produzir trinta vezes mais frutos do que indivíduos com flores perfeitas. Isso indica que está acontecendo uma potencialização dos recursos, em que as flores pistiladas investem na qualidade do óvulo e do ovário para gerarem muitas sementes e frutos e as flores perfeitas investem na produção de pólen. Nossos resultados sugerem que a ginodioicia pode ser um caminho intermediário entre a cossexualidade e a dioicia.

Palavras-chave: evolução floral, vascularização floral, histoquímica, nectários, perianto.

1. Introdução

A ginodioicia é caracterizada como um sistema reprodutivo onde as populações são compostas pela presença de indivíduos com flores perfeitas e espécimes com flores apenas pistiladas (Sakai & Weller 1997; Cardoso et al. 2018). Este sistema sexual é raramente encontrado em angiospermas, menos de 1% das espécies (Renner 2014; Caruso et al. 2016). As especializações das funções femininas e masculinas levaram a mudanças na estrutura floral, com uma alocação de recursos diferente para cada morfotipo floral (Gibson & Diggle 1997). Os indivíduos hermafroditas mantêm o seu “fitness” investindo na qualidade do pólen, enquanto os indivíduos com flores pistiladas investem seus recursos nos frutos e sementes (Lloyd 1975).

Em Lauraceae a ginodioicia é rara, somente encontrada em cerca de 50 espécies (5%) dos gêneros *Andea* van der Werff e *Ocotea* Aubl. p.p. (grupo *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez) na região neotropical (Alves et al. *no prelo*). Cabe destacar que esse sistema sexual é muito difícil de identificar em Lauraceae, onde flores unissexuais frequentemente

retêm estruturas estéreis do sexo oposto (Rohwer 1993; Penagos-Zuluaga et al. 2021). Em flores estaminadas e perfeitas é desafiador distinguir entre um pistilódio estéril e um pistilo fértil em espécimes de herbário. A diferenciação depende da verificação da fertilidade do óvulo, o que requer flores frescas ou observações de campo. Tradicionalmente, espécimes férteis de herbário descritas como dioicas possuem flores evidentemente pistiladas e perfeitas, o que torna a ginodioicia um sistema sexual de difícil identificação (Penagos-Zuluaga et al. 2021).

Historicamente, a taxonomia de Lauraceae tem sido baseada principalmente na composição do androceu (Kostermans 1957; van der Werff 1991; Rohwer 1993). No entanto, em filogenias recentes, vários grupos tradicionais surgiram como parafiléticos ou polifiléticos (e.g., Chanderbali et al. 2001; Rohwer & Rudolph 2005; Alves & Souza 2013; Trofimov et al. 2016; Rohde et al. 2017; Trofimov & Rohwer 2020; Penagos-Zuluaga et al. 2021). Portanto, novos atributos que possam servir para delimitar grupos e ajudar a entender a evolução da família precisam ser identificados (Nishida & van der Werff 2007, 2011; Trofimov et al. 2016; Zeng et al. 2017).

Ocotea Aubl. é o maior gênero de Lauraceae nos Neotrópicos, com cerca de 400 espécies (Trofimov et al., 2019), caracterizado por espécies cossexuais, dioicas ou ginodioicas com 9 estames férteis, anteras 4-loceladas e estames da série IV pouco desenvolvidos. O gênero foi dividido em grupos baseado especialmente nos atributos florais por Rohwer (1986), entretanto, emergiu polifilético em vários estudos filogenéticos (Chanderbali et al., 2001; Rohwer & Rudolph, 2005; Trofimov et al., 2019; Penagos-Zuluaga et al., 2021) dentro do complexo *Ocotea* (Chanderbali et al., 2001), também chamado de clado *Supraocotea* (Penagos-Zuluaga et al., 2021). Já o grupo *Ocotea minarum* (*sensu* Rohwer 1986) emergiu monofilético nas mais recentes filogenias (Chanderbali et al., 2001; Rohwer & Rudolph, 2005; Trofimov et al., 2019; Penagos-Zuluaga et al., 2021), caracterizado por espécies ginodioicas

Existem poucos estudos com dados comparativos de morfologia e anatomia realizados com espécies ginodioicas do complexo *Ocotea* (e.g., Gibson & Diggle 1997, 1998). Os dados escassos têm limitado nosso conhecimento sobre a evolução dos sistemas sexuais dentro de Lauraceae. As investigações sobre a anatomia floral de espécies ginodioicas podem nos ajudar a responder questões sobre a evolução da ginodioicia, nos fornecendo ferramentas importantes para o entendimento das diferenças entre os morfotipos florais e como a perda de função de alguns órgãos é refletida na anatomia. Entender sobre a evolução do sistema reprodutivo também se tornou uma questão importante dentro de Lauraceae. O sistema reprodutivo tem sido historicamente usado na delimitação genérica (Kostermans 1957; van der Werff 1991; Rohwer 1993) e contém um sinal filogenético na família (Penagos-Zuluaga et al. 2021; Trofimov et al. 2022).

Portanto, o objetivo do trabalho foi realizar um estudo de biologia comparada com dados de morfologia floral, anatomia e do *fruit set* da espécie ginodioica *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez (Lauraceae) respondendo às seguintes perguntas (1) Quais as diferenças morfológicas e anatômicas entre órgãos florais homólogos (perianto, androceu, gineceu, nectários e vascularização) de flores perfeitas e pistiladas? (2) Plantas com flores pistiladas produzem mais frutos do que aquelas com flores perfeitas? (3) Os dados gerados podem nos ajudar a entender a evolução floral e a ginodioicia em *Ocotea minarum* e em Lauraceae?

2. Material e métodos

Material coletado

Os espécimes de *Ocotea minarum* de flores perfeitas e pistiladas foram coletados no estado de Mato Grosso do Sul, na cidade de Campo Grande. As flores em pré-antese e antese em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas e armazenadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). O material foi deixado no fixador até todos ramos com flores afundarem e para isso foram passados pela bomba a vácuo de hora em hora (aproximadamente 48 horas). Posteriormente, o fixador foi removido e o material foi lavado com solução tampão fosfato de sódio 0,2 M em pH 7,2 por dez minutos, depois passaram pelo processo de desidratação em série alcoólica e foram armazenados em álcool 70%.

Análise morfológica

A morfologia das flores foi analisada e registrada sob estereomicroscópio Leica M205 com uma câmera Leica DCF 420 acoplada. Foram medidas 25 flores perfeitas (5 flores de 5 indivíduos diferentes) e para as flores pistiladas foram medidas 10 flores (5 flores de 2 indivíduos diferentes). Os dados obtidos foram usados para montar uma tabela comparativa da dimensão de cada órgão floral. Flores frescas em antese foram mergulhadas em vermelho neutro e Sudan IV para identificação de osmóforos (Dafni, 1992).

Análise anatômica e histoquímica

Para realizar a confecção das lâminas, os materiais armazenados em álcool 70% foram selecionados e desidratados em série alcoólica, do álcool 70% até 95%. Em seguida foram embebidos em historesina - solução de pré-infiltração (Leica® activated historesin + 95% ethanol, 1:1) durante dois dias e transferidos para resina pura onde permaneceram por um mês. Posteriormente, os materiais foram emblocados em historesina (Leica®) de acordo com a técnica para emblocamento (Gerrits & Horobin 1991). Os cortes transversais e

longitudinais foram obtidos em micrótomo rotativo Leica modelo RM-2145 com espessura de 0.4 μm e corados em azul de Toluidina pH 4,4 (O' Brien *et al.* 1964). Para histoquímica, as flores fixadas e desidratadas foram infiltradas em resina, seccionadas em micrótomo rotativo e submetidas aos seguintes reagentes: Sudan IV (Pearse, 1985) para identificação de idioblastos de óleo; reagente de Schiff em ácido periódico para detecção de polissacarídeos (Jensen, 1962) e lugol para identificação de amido (Johansen, 1940). As análises anatômicas e as fotomicrografias foram obtidas em microscópio Nikon Eclipse Ci acoplado a câmera digital Cam Pro 252B.

Análise da vascularização

Para análise de vascularização, as flores foram escaneadas em tomografia computadorizada de raios X de alta resolução (HRXCT) e reconstruídas com o programa XM3DViewer. As flores armazenadas em álcool 70% foram tratadas em uma solução de ácido fosfotúngstico a 1% e etanol 70% por uma semana (Staedler *et al.* 2013, 2018). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série alcoólica com 1% de ácido fosfotúngstico, passadas em acetona e levadas ao equipamento de Ponto crítico Leica EM CPD300 para secagem completa. A microtomografia foi realizada usando um sistema de imagem MicroXCT-200 (Zeiss Microscopy) com uma fonte de raios X Microfocus L9421-02 de 90 kV (Hamamatsu Photonics, Iwata City, Japão). O programa XMReconstructor 8.1.6599 (Zeiss Microscopy) foi usado para reconstruções 3D e o programa XM3DViewer 1.1.6 baseado em AMIRA (Zeiss Microscopy) para visualizar os dados gerados e para criar reconstruções 2D e 3D.

Fruit Set

Para a realização do fruitset foram escolhidos dez indivíduos, cinco indivíduos com flores pistiladas e cinco indivíduos com flores perfeitas. Para cada indivíduo foram selecionados três ramos com inflorescência, as flores foram contadas e os ramos marcados com uma etiqueta numerada. Posteriormente, quando os frutos estavam formados, a contagem foi realizada novamente nos mesmos ramos para verificar quantos frutos foram formados em relação à quantidade de flores produzidas.

3. Resultados

Organização floral

Ocotea minarum é uma árvore ginodioica de cerca de 8 m altura de folhas alternas e limbo foliar elíptico (Fig. 1). As flores são compostas por dois verticilos de tépalas, com três tépalas cada, classificadas em tépalas externas e internas. As tépalas das flores perfeitas em antese ficam dispostas horizontalmente, enquanto nas flores pistiladas são mais curtas e ficam dispostas verticalmente (Fig. 1A-B). As flores perfeitas são maiores e apresentam tépalas, estames e pistilo mais compridos do que as flores pistiladas. Por outro lado, o ovário e o estigma são maiores e mais largos em flores pistiladas (Tab. 1). Os estames das flores perfeitas e os estaminódios das flores pistiladas estão distribuídos em três séries (verticilos) com três órgãos em cada (Fig. 1A-B). Os estames/estaminódios da série I são opostos às tépalas externas, os da série II são opostos às tépalas internas e os estames/estaminódios da série III ficam opostos aos estames da série I (Fig. 1A-B). Os estames e estaminódios são tetralocelados (4 locelos) em todos os verticilos (Fig. 1C-F). Nas flores pistiladas os locelos não se abrem (Fig. 1 D), apresentam apenas a marcação dos locelos nos estaminódios. Os estames/estaminódios da série III possuem um par de glândulas globosas e amarelas na base do filete (Fig. 1E-F). As séries I e II possuem locelos expostas externamente, ou seja, os estames e estaminódios são extrosos, enquanto na série III as aberturas dos locelos estão dispostas lateralmente, sendo denominados latrosos. Cabe destacar que em cerca de 40% das flores perfeitas analisadas havia número superior de estames em cada uma das séries, podendo alcançar 12 estames férteis.

O gineceu é unicarpelar, unilocular e uniovular em ambos os morfotipos (Fig. 1G-H). Nas flores pistiladas (Fig. 1B), o pistilo é mais evidente com estigma e ovário mais largos e o estigma fica posicionado acima dos estaminódios de série III. Nas flores perfeitas, o estigma, geralmente, fica abaixo dos estames da série III, assim, fica menos evidente, apesar de possuir um estilete mais comprido e ovário mais estreito.



Figura 1. *Ocotea minarum*. A. Árvore com flores pistiladas. B. Ramo com inflorescências e flores perfeitas; C. Ramo com inflorescências e flores pistiladas; D. Ramo com frutos; E. Detalhe do fruto.

Tabela 1. Medidas das flores e dos órgãos florais de *Ocotea minarum*.

Estruturas florais	Flores perfeitas	Flores pistiladas
Diâmetro da flor	3 – 6 mm	3 – 4 mm
Comprimento da flor	2,7 – 6 mm	2,9 – 4 mm
Tépalas	2,2 – 4 mm	1,7 – 3 mm
Estames/Estaminódios séries I e II	1,3 – 2 mm	0,6 – 1 mm
Estames/Estaminódios série III	1,5 – 2,1 mm	1 – 1,3 mm
Antera	1 – 1,3 mm	0,5 – 0,8 mm
Filete	0,5 – 1 mm	0,4 – 0,5 mm
% da antera no estame	55,88%	53,31%
Glândulas	0,3 – 0,7 mm	0,4 – 0,5 mm
Pistilo	1,8 – 2,5 mm	1,5 – 2 mm
Comprimento do ovário	0,4 – 0,9 mm	0,5 – 0,9 mm
Largura do ovário	0,4 – 1 mm	0,5 – 1,1 mm
Estigma	0,1 – 0,2 mm	0,4 – 0,6 mm
% do estilete no pistilo	68,00%	59,22%

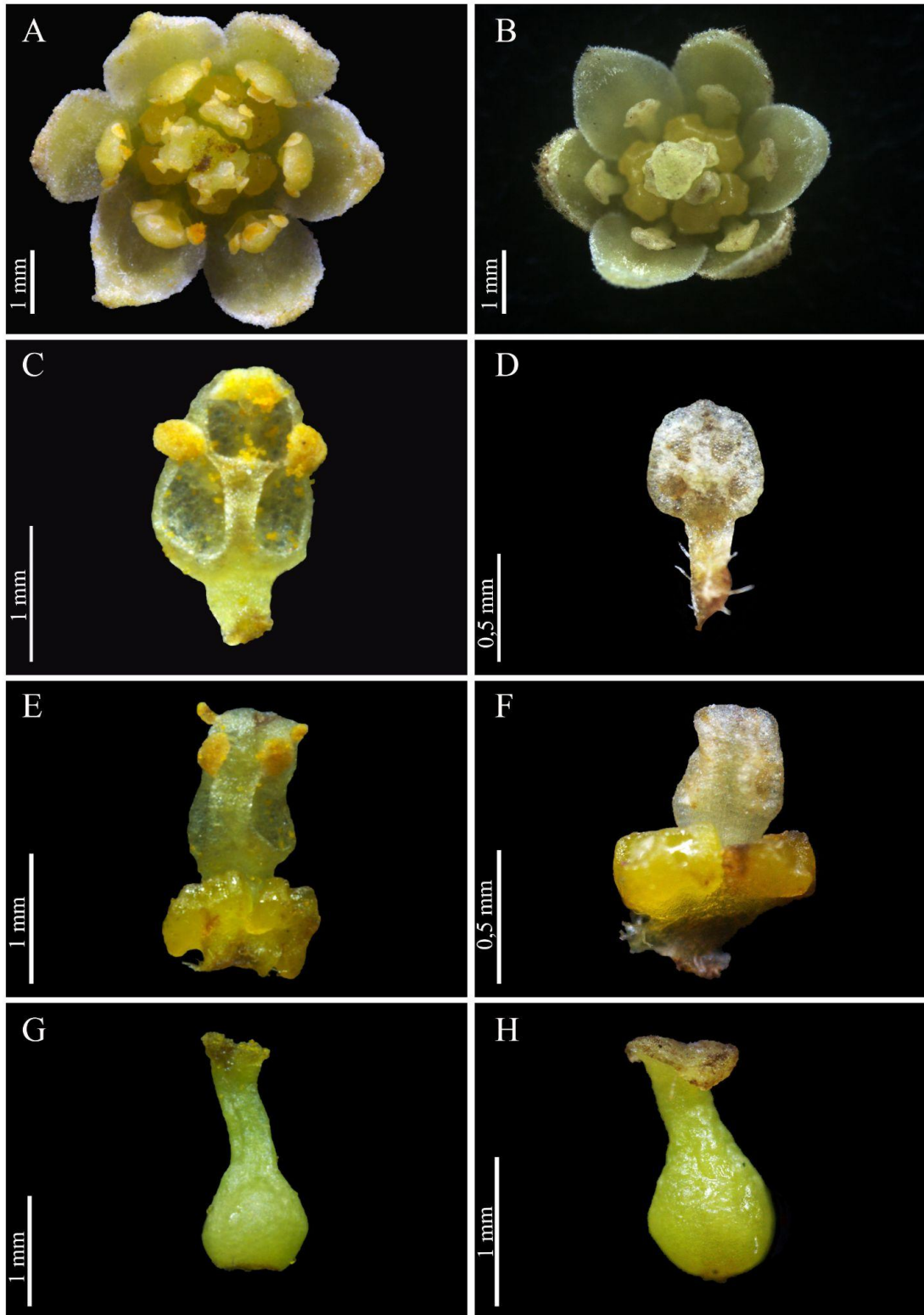


Figura 2. Flores e órgãos florais de *Ocotea minarum*. A. Flor perfeita; B. Flor pistilada; C. Estame da série II da flor perfeita; D. Estaminódio da série II da flor pistilada; E. Estame da série III e glândula da flor perfeita; F. Estaminódio da série III e glândula da flor pistilada; G. Pistilo da flor perfeita; H. Pistilo da flor pistilada.

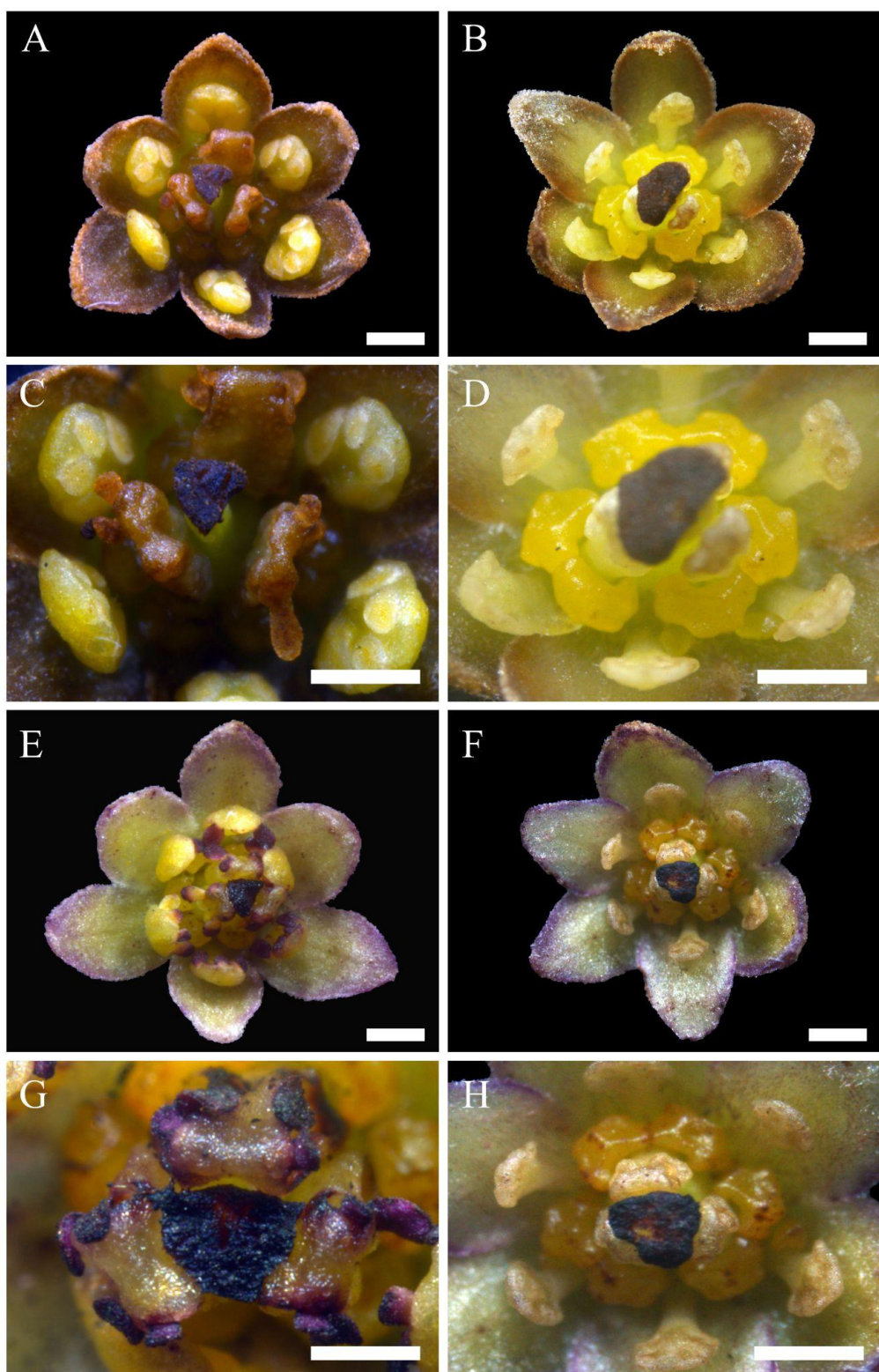


Figura 3. Flores de *Ocotea minarum* coradas com Vermelho Neutro e Sudan IV. A, C, E e G. Flores perfeitas; B, D, F e H. Flores pistiladas; A, B, C e D. Flores coradas com Sudan IV, reação positiva para lipídios nos estames da série III, estigma e região envolta das tépalas; E, F, G e H. Flores coradas com Vermelho Neutro, evidenciando as valvas dos estames da série III, o estigma e pequenas pontuações coradas nas glândulas.

Anatomia floral

As flores em ambos os morfotipos florais são semelhantes anatomicamente, a principal diferença está nos órgãos do androceu (Fig. 4A-B). As tépalas internas e externas apresentam tricomas nas faces abaxial e adaxial. A epiderme é unisseriada, subjacente há uma camada subepidérmica de células menores e achatadas (Fig. 4E - F). O parênquima do mesofilo é composto de quatro a oito camadas homogêneas de células arredondadas com idioblastos de óleo (Fig. 4E - F).

Os estames e estaminódios apresentam uma epiderme unisseriada e papilosa nos filetes, córtex com parênquima homogêneo e idioblastos de óleo (Fig. 4C-D). As anteras apresentam uma epiderme unisseriada e na região valvar um endotécio com parede lignificada principalmente nas flores perfeitas (Fig. 4C). Nas flores pistiladas, o endotécio está presente, porém é menos lignificado, o microsporângio não se desenvolve e não forma grãos de pólen (Fig. 4D). Nas flores perfeitas, os microsporângios formam grãos de pólen viáveis (Fig. 4C).

O gineceu nos dois morfotipos florais apresenta epiderme externa unisseriada com células achatadas lateralmente (Fig. 4G-H). O mesofilo do carpelo possui parênquima multi-estratificado homogêneo e com idioblastos de óleo (Fig. 4G-H). A epiderme interna do carpelo também é unisseriada e possui compostos fenólicos (Fig. 4G-H). Os dois morfotipos possuem óvulo desenvolvido.

A glândula na base do filete, dos estames da série III, está presente em ambos os morfotipos florais (Fig. 5A-B). Sua epiderme é simples formada por células achatadas e o parênquima é regular com células arredondadas e amplo vacúolo. Testes de histolocalização para lipídios, amido e polissacarídeos (Fig. 6) foram negativos na epiderme e no parênquima das glândulas (Fig. 5). Entretanto, as flores frescas testaram positivo para Sudan IV e Vermelho Neutro na região envolta das tépalas (Fig. 3 A, B, E e F), nos estames da série III (Fig. 3C) e no estigma (Fig. 3 G e H).

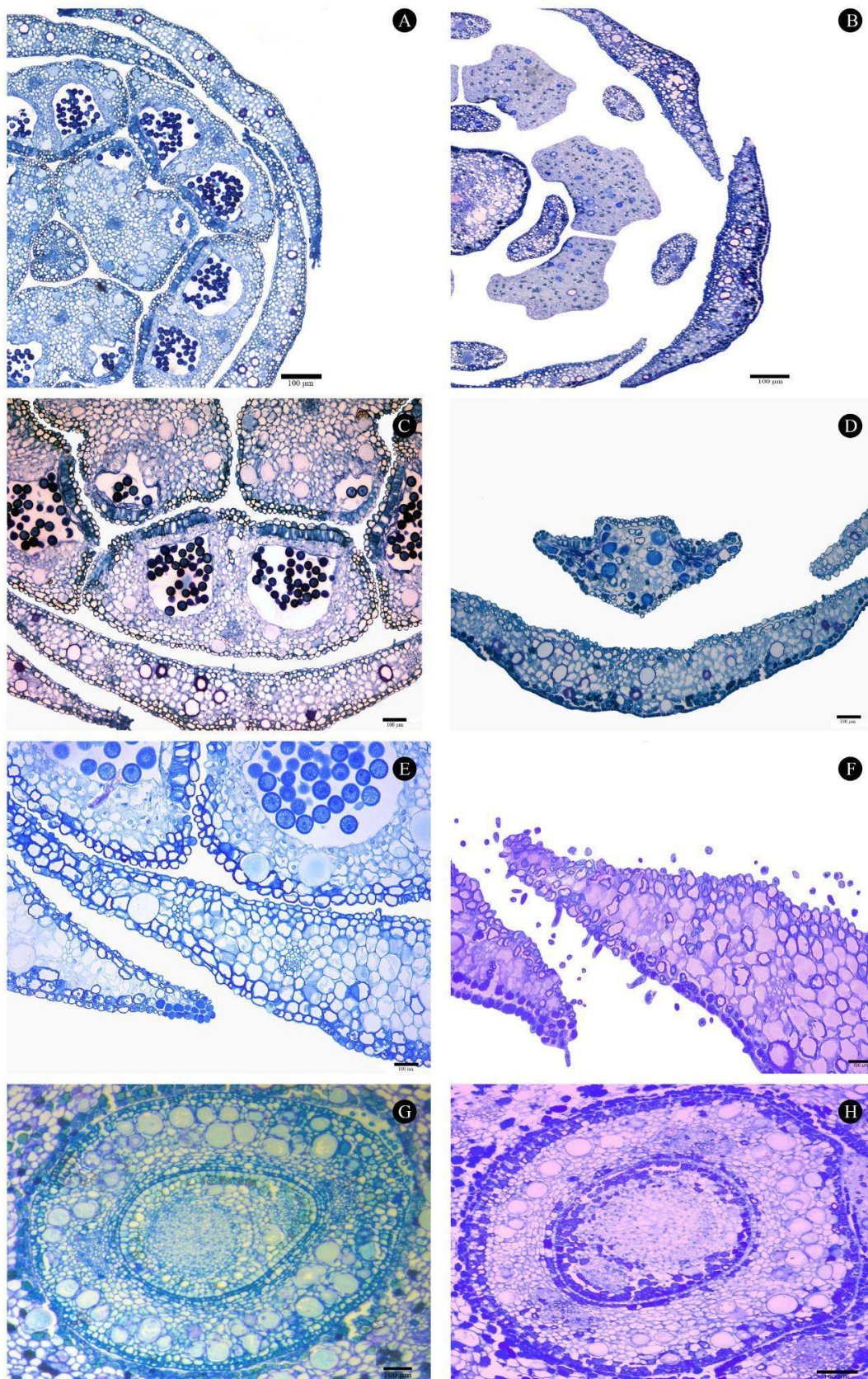


Figura 4. Anatomia comparada da flor perfeita e pistilada de *Ocotea minarum* em corte transversal. A, C, E e G. Flores perfeitas; B, D, F e H. Flores pistiladas; A-B. Corte

transversal da região mediana da flor; C. Detalhe da tépala interna e do estame; D. Detalhe da tépala externa e do estaminódio; E-F. Detalhe das tépalas internas, note os feixes vasculares; G-H. Parede do ovário e ao centro o óvulo, evidenciando os dois feixes no ovário e um feixe ligado ao óvulo.

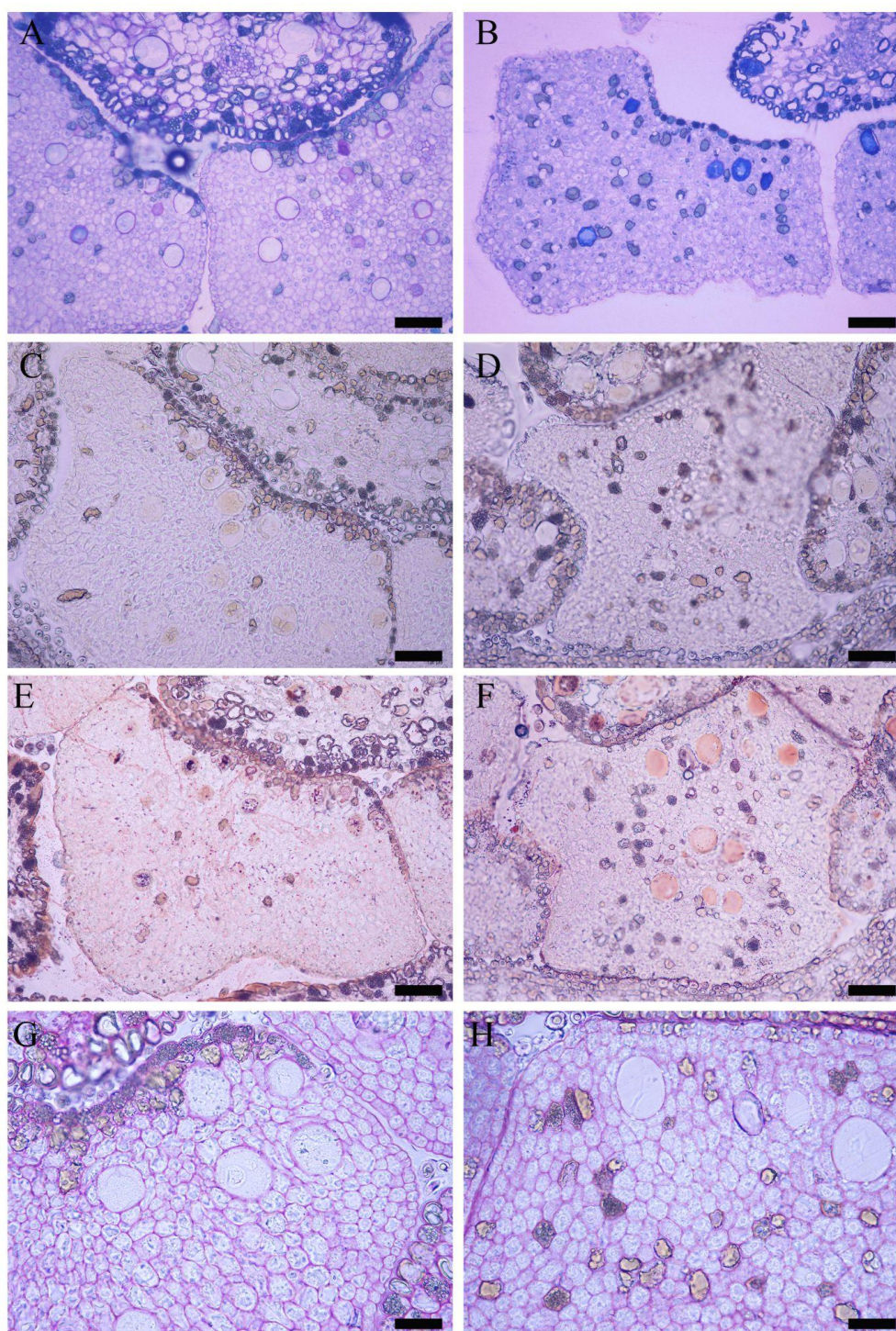


Figura 5. Anatomia e testes histoquímicos das glândulas de flores perfeitas e pistiladas de *Ocotea minarum*. A, C, E e G. Flores perfeitas; B, D, F e H. Flores pistiladas; A-B. Corte transversal das glândulas coradas com Azul de Toluidina; C-D. Glândulas coradas com Lugol, reação negativa para amido na epiderme e no parênquima; E-F. Glândulas coradas com Sudan IV, reação negativa para lipídios na epiderme e no parênquima; G-H. Parênquima das glândulas com reação negativa a polissacarídeos (PAS). Barra da escala: 20 μ m.

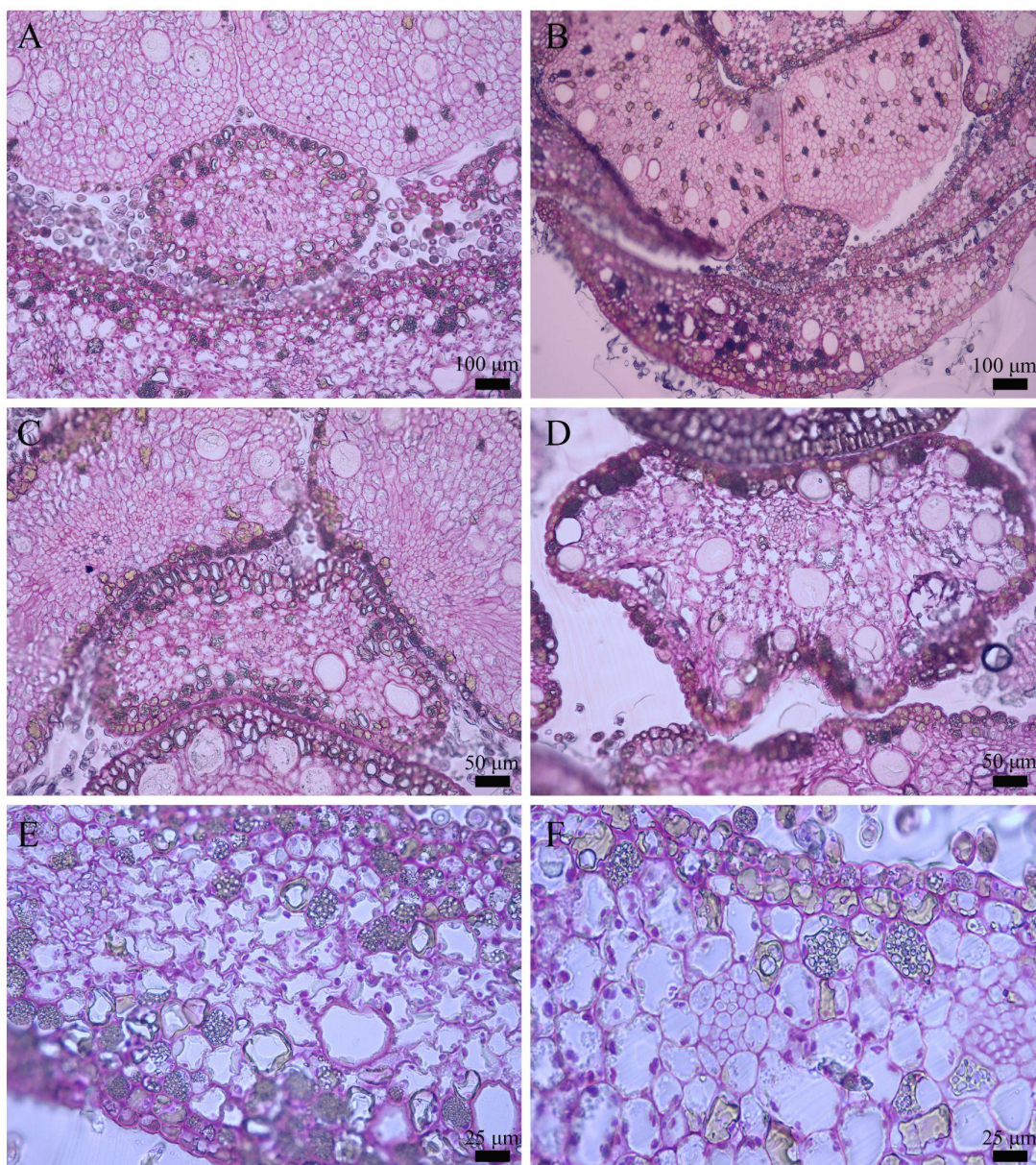


Figura 6. Anatomia e teste histoquímico com reagente de Schiff de flores perfeitas e pistiladas de *Ocotea minarum*. A, C e E. Flores perfeitas; B, D e F. Flores pistiladas; A-B. Glândulas com reação negativa a polissacarídeos, estames e tépalas com reação positiva; C-D. Estames/estaminódios da série III, reação positiva a polissacarídeos; E-F Tépalas externas, reação positiva a polissacarídeos.

Vascularização

A vascularização na base do hipanto é formada inicialmente por seis feixes vasculares (Fig. 3A-B), cada um desses feixes alternadamente irá se ramificar e formar dois conjuntos de feixes vasculares (Fig. 3C-E). Os primeiros feixes a se destacarem são os feixes dos estames/estaminódios da série III (Fig. 3E), seguidos pelos feixes das tépalas externas e dos feixes dos estames/estaminódios da série I (Fig. 3F), juntamente com os feixes laterais dos estames da série III que irão vascularizar as glândulas, totalizando três feixes vasculares na base dos estames da série III (Fig. 3H). Esses feixes vasculares formam o primeiro conjunto da vascularização. Os feixes vasculares dos estames/estaminódios da série II e das tépalas internas são individualizados, formando o segundo conjunto da vascularização (Fig. 3D-H). Os feixes laterais dos estames/estaminódios da série III, dividem-se ainda mais e irrigam as glândulas (Fig. 3K-L), e somente um feixe é direcionado para a antera (Fig. 3K-L).

Os dois morfotipos florais em antese apresentam quantidades similares de feixes vasculares em cada órgão (Tab. 02). Nas flores perfeitas, ocorrem 5 feixes vasculares nas tépalas externas e internas, um feixe vascular nos estames de série I, II e III, e três feixes vasculares no ovário. Nas flores pistiladas há uma variação de três a cinco feixes vasculares das tépalas externas e internas, um feixe nos estaminódios de série I, II e III, e três feixes no ovário. As glândulas da série III do androceu, cada uma do par, recebem um feixe vascular na base que se ramifica em numerosos feixes na região do parênquima da glândula (Fig. 3I-J).

Tabela 02. Feixes vasculares presentes nos órgãos florais de *Ocotea minarum*.

Órgãos florais	Flor perfeita	Flor pistilada
Tépalas externas	5	3 - 5
Tépalas internas	5	3 - 5
Estames/Estaminódios série I	1	1
Estames/Estaminódios série II	1	1
Estames/Estaminódios série III	1	1
Glândulas	numerosos	numerosos
Pistilo	3	3

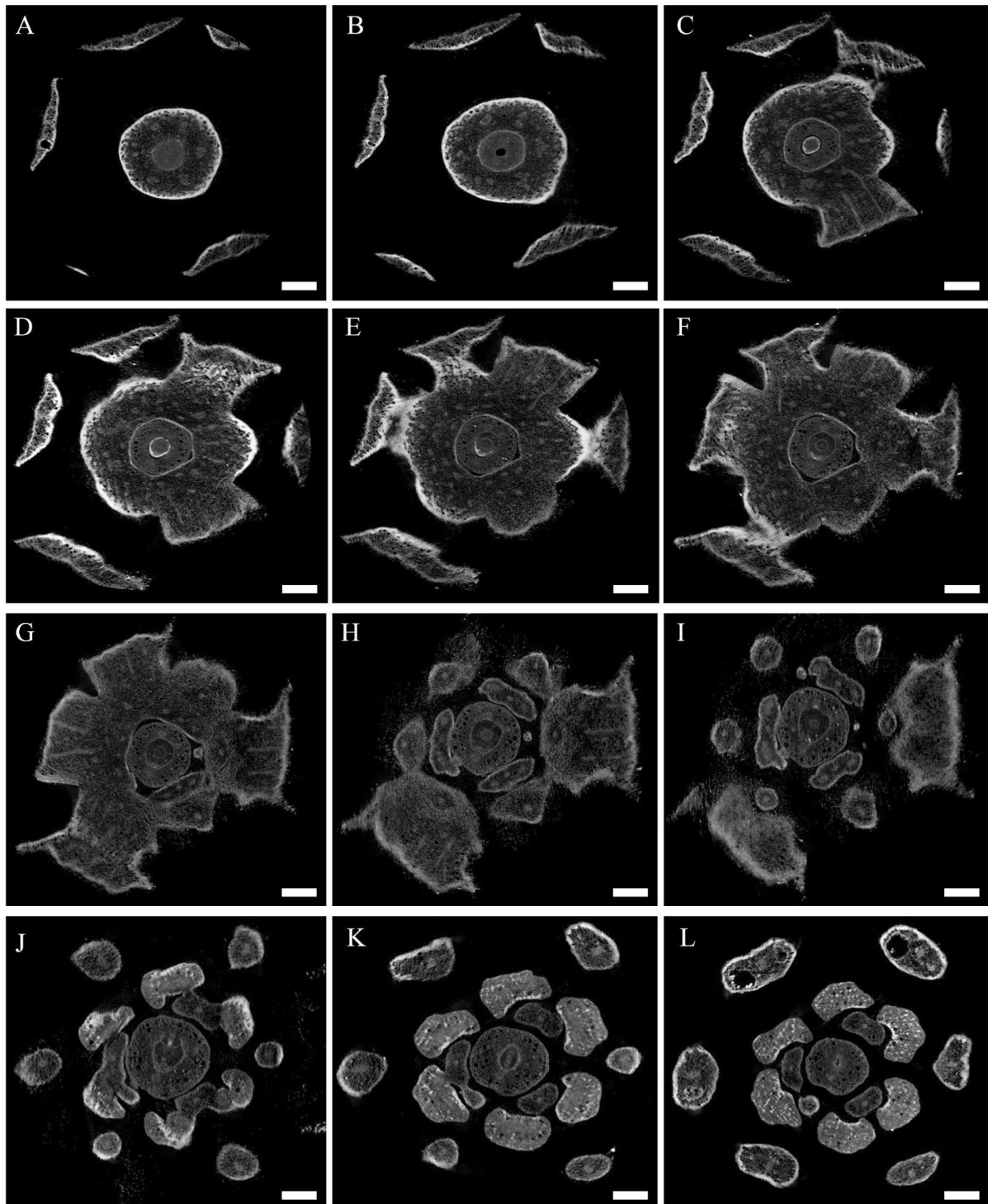


Figura 4. Vascularização dos verticilos florais da flor perfeita de *Ocotea minarum*. A-B. Hipanto e base do ovário. C-D. Feixes vasculares divergindo. E-F. Início da organização dos feixes que irão vascularizar os estames. G-I. Vascularização dos estames de série I, II, e III e do pistilo. J-K. Vascularização das glândulas. L. Organização final da vascularização. Barra da escala: 500 μ m.

Fruit set

Todos os indivíduos que possuem flores pistiladas (100%) produziram frutos, enquanto apenas 20% dos indivíduos com flores perfeitas frutificaram. Plantas com flores pistiladas produziram 30 vezes mais frutos do que plantas com flores perfeitas. Veja os dados quantitativos na Tabela 3.

Tabela 3. Fruit set dos indivíduos de *Ocotea minarum* com flores perfeitas e pistiladas.

	Perfeita	Pistilada
Indivíduos	5	5
Plantas frutificando	20%	100%
Ramos	15	15
Quantidade de flores avaliadas	5805	6310
Quantidade de frutos formados	14	465
% de frutos/flor	0,24%	7,36%

4. Discussão

Nossos resultados confirmam que *Ocotea minarum* é uma espécie ginodioica através de análises morfológicas, anatômicas e de produção de frutos dos dois morfotipos florais, *i.e.*, flores perfeitas e pistiladas. Assim, este estudo corrobora com as observações de herbário da espécie (Rohwer 1986; Baitello et al. 2003; Penagos-Zuluaga 2021). Em plantas ginodioicas as estruturas masculinas são maiores em flores perfeitas e as partes femininas maiores em flores pistiladas (Moon & Hong 2015; Zhang & Claßen-Bockhoff 2019). Embora diferenças significativas entre morfotipos florais na espécie ginodioica *Ocotea oblonga* (Meisn.) Mez não sejam evidentes (Penagos-Zuluaga 2020) na maioria das espécies em Lauraceae flores perfeitas ou estaminadas são maiores que flores pistiladas em uma mesma espécie ginodioica (Baitello et al. 2003; Gibson & Diggle 1997). As diferenças entre os tamanhos das flores e estruturas florais se tornam ainda mais acentuadas em plantas dioicas (Pacini et al. 2014; Silva et al. 2024). A diferença dos tamanhos dos morfotipos florais em plantas ginodioicas está intimamente relacionado à estratégia reprodutiva da planta (Bawa 1980; Bell 1985; Delph 1996) e estruturalmente ligado a redução dos feixes vasculares em flores pistiladas (Schmid 1972a, b; Silva et al. 2024).

Estudos sobre anatomia floral mostraram uma grande diversidade no número de feixes vasculares em estruturas florais em Lauraceae (e.g., Reece 1939; Kasapligil 1951; Sastri 1952; Boyle 1980; Souza & Moscheta 1999, 2000; Sajo et al. 2016). Embora na maioria das espécies na família ambos os verticilos das tépalas de uma mesma flor (internas e externas) sejam vascularizados pelo mesmo número de feixes (e.g., Souza & Moscheta 2000; Sajo et al. 2016; Soares 2017; Silva et al. 2024), pode haver espécies com mais feixes nas tépalas externas em comparação com as tépalas internas (Sastri 1952, 1965, Kasapligil 1951). Ao mesmo tempo, o número de feixes vasculares por tépala pode diferir entre flores estaminadas e pistiladas em espécies dioicas (Boyle 1980; Souza & Moscheta 1999; Silva et al. 2024) ou mesmo em flores perfeitas e pistiladas como verificamos aqui em *Ocotea minarum*. No caso da espécie ginodioica *Ocotea minarum*, embora haja o mesmo número de feixes nas tépalas externas e internas de uma mesma flor, há menos feixes vasculares em algumas tépalas das flores pistiladas quando comparado com as flores perfeitas. Esse resultado pode ser consequência da redução dos estames em estaminódios gerando estruturas menores nas flores pistiladas (Tab. 1).

Tecidos vasculares da planta formam feixes que conectam todas as partes da planta, dão suporte mecânico e distribuem água e nutrientes, bem como outras substâncias necessárias para o crescimento e defesa (Lehesranta et al. 2010). Os tecidos vasculares formam um sistema eficiente de condução de fluidos que se estende por todo o corpo da planta. Além de fornecer transporte de longa distância de água, açúcares, nutrientes, hormônios e outras moléculas de sinalização, também contribui para o suporte mecânico (Smet & Rybel 2016). A redução dos órgãos florais está ligada a menor alocação de recursos para essas estruturas, gerada pela diminuição da vascularização e consequentemente atrofia tecidual (Schmid 1972 a, b). Os feixes vasculares são responsáveis por controlar o tamanho e a forma das estruturas florais com órgãos grandes tendo um número maior de feixes e uma estrutura vascular mais ramificada, enquanto órgãos menores têm menos feixes e menos ramificação (Schmid 1972a, b; Lehesranta et al. 2010). Portanto, os feixes são estruturas funcionais resultantes de fatores fisiológicos e fundamentais como relíquias expondo a perda evolutiva de órgãos (Carlquist 1969; Stebbins 1967).

Conflitos nutricionais entre as funções masculina e feminina dentro de uma flor podem expressar forças seletivas que mantêm genes de esterilidade masculina e feminina nos morfotipos e impulsionam a evolução para a diclinia floral (Gibson & Diggler 1997). Enquanto espécies cossexuais têm um alto investimento em recursos para pólen e estruturas florais, plantas com flores pistiladas são liberadas do custo da função masculina e

podem realocar recursos do pólen para a formação de sementes (Darwin 1877; Ashman 1994). A exclusão da autofertilização alcançada pela dioícia aumenta a eficiência da alocação de nutrientes para a reprodução (Freeman et al. 1976; Thomson & Brunet 1990), mantendo a variabilidade genética (Bawa 1980) e gerando plantas que produzem mais que o dobro de sementes que espécies cossexuais (Sakai & Weller 1991). A alocação de recursos para reprodução e a divisão desses recursos entre estruturas reprodutivas são de importância central para teorias da evolução do sistema reprodutivo e a estabilidade do hermafroditismo em plantas (por exemplo, Charlesworth & Charlesworth 1978, 1981; Lloyd & Bawa 1984; Charlesworth 1989; Ashman 1994).

Em geral, o sucesso reprodutivo de espécimes com flores estaminadas é limitado pelo acesso aos gametas femininos, enquanto o sucesso de espécimes com flores pistiladas é limitado pelos recursos disponíveis para a produção de óvulos. Consequentemente, os indivíduos com flores estaminadas tendem a otimizar a produção de pólen, enquanto os indivíduos com flores pistiladas otimizam a qualidade do ovário e do óvulo (Bawa 1980). Portanto, flores pistiladas produzem flores menores (Gibson & Diggler 1997) e menos néctar (Ashman & Stanton 1991; Eckhart 1992) em comparação com flores estaminadas (Ashman 1994). No caso de *Ocotea minarum*, o fato de encontrarmos cerca de 40% das flores perfeitas com número superior de estames indica um investimento diferencial na produção de pólen nesse morfotipo. Por outro lado, o maior tamanho dos ovários e estigmas das flores pistiladas em relação às mesmas estruturas das flores perfeitas, demonstra o maior investimento na formação das sementes para reprodução.

A vascularização encontrada em *Ocotea minarum* segue um padrão para Lauraceae, em que o mesmo feixe que vasculariza as tépalas externas, também irriga os estames da série I e III e os nectários, enquanto o feixe que vasculariza as tépalas internas também irriga os estames da série II e IV (Sajo et al. 2016). Entretanto, em outras espécies de Lauraceae, pode haver o compartilhamento de feixes de ramos laterais de um mesmo eixo por tépalas das duas séries (Boyle 1980; Soares 2017; Silva et al. 2024).

Embora estudos filogenéticos recentes indicarem uma ancestralidade cossexual para o clado dioico em *Ocotea* (Chanderbali et al. 2001; Trofimov et al. 2019; Penagos-Zuluaga et al. 2021), autores consideram a ginodioícia um estágio intermediário no caminho da cossexualidade para a dioícia (Charlesworth & Charlesworth 1978; Bawa 1980; Charlesworth 1999; Dufay et al. 2014). A dioícia não teria surgido como um mecanismo de seleção para evitar a endogamia, mas da alocação diferencial de recursos para potencializar a formação de frutos, sementes na reprodução (Darwin 1877; Bawa 1980; Rohwer 1986). Lauraceae já possuem ciclo protogínico heterodicogâmico nas espécies cossexuais como forma para

evitar a autofertilização (Kubitzki & Kurz 1984; Kubitzki et al. 1993). Deste modo, em Lauraceae é provável que a ginodioicia e a dioicia tenham surgido como uma forma para otimizar a alocação diferencial de recursos entre a produção de pólen e óvulos, potencializando a produção de frutos e sementes e não para evitar a autopolinização. Com relação os estudos filogenéticos (e.g., Penagos-Zuluaga et al., 2021; Trofimov et al. 2022) terem apontado ancestrais cossexuais para o clado dioico de *Ocotea*, é importante ressaltar que filogenias tem como fonte de dados os semaforontes (Hennig 1966; Havstad et al. 2015; Assis 2016) e ancestrais extintos sem conhecimento pelo registro fóssil podem ter sido apagados da história evolutiva dos grupos, dificultando o entendimento de intermediários. A utilização de semaforontes nas reconstruções filogenéticas pode obscurecer o impacto total das extinções, já que 99% das espécies que já existiram estão agora extintas (Hoehna et al., 2019). Técnicas mais avançadas incorporam comprimentos de ramificação para quantificar as taxas de especiação e extinção, permitindo uma compreensão mais matizada da perda de linhagem (Stadler, 2013).

A maioria das espécies de Lauraceae têm nectários na série III do androceu (Kostermans 1957; van der Werff 1991; Rohwer 1993), embora eles também possam estar presentes em todos os estames, como em *Chlorocardium*, *Phyllostemonodaphne* e *Urbanodendron* (Rohwer 1993) ou totalmente ausentes em *Anaueria*, *Mezilaurus* e *Williamodendron* (Rohwer 1993; Alves & Souza 2013). Tais estruturas foram interpretadas como estames reduzidos (Sastri 1965), estruturas independentes (Rohwer 1994), emergências secretoras de néctar não homólogas a nenhum órgão (Rohwer 1993) ou apenas um atributo do terceiro verticilo (Kasapliligil 1951; Buzgo et al. 2007).

Como o néctar é a recompensa mais importante para plantas com flores polinizadas por animais, sua ocorrência, posição e características são dados comparativos úteis para avaliar relacionamentos (Simpson & Neff, 1983; Bernardello 2007). Embora em angiospermas uma das razões para a grande diversidade observada na estrutura do nectário e nos constituintes do néctar depende em grande parte do tipo de polinizador (Baker & Baker 1975; Pacini et al. 2003), a especialização fenotípica floral em algumas espécies pode não ter relação com a estrutura do nectário floral (González et al. 2021). Além do mais, a pequena quantidade de néctar produzida no nectário pode estar relacionada à presença de um único óvulo no ovário. Isso significa que poucos grãos de pólen são necessários no estigma para garantir a fertilização e, portanto, visitas menos frequentes de polinizadores e menor volume de néctar como recompensa a esses visitantes podem ser suficientes (Pacini et al. 2014).

A ausência de amido e polissacarídeos na epiderme e no parênquima das glândulas em *Ocotea minarum* provavelmente se deve a tal estrutura não estar relacionada ao sistema de polinização da espécie. Segundo Judkevich et al. (2022), nectários persistentes podem permanecer intactos nas flores mesmo sem produzir néctar ou podem produzir alguma secreção por um tempo depois da antese ou durante a diferenciação dos frutos. Em *Ocotea minarum* o ápice dos estames de série III e o estigma podem estar funcionando como os atrativos principais de polinizadores, direcionando os insetos para dentro da flor. São encontrados osmóforos nas tépalas e muitos idioblastos de óleo em todos os verticilos florais nos dois morfotipos florais, que são estruturas importantes para a atração de polinizadores. O néctar produzido pelos nectários geralmente serve como recompensa para os polinizadores, mas também pode atrair insetos pilhadores. A atração destes insetos pode causar danos às estruturas florais, levando a mudanças no comportamento dos polinizadores (Kessler et al. 2010).

Nectários podem funcionar como fonte de alimento para os herbívoros, evitando que as tépalas sejam danificadas. A taxa de visitação por polinizadores pode decair significativamente com o aumento dos danos causados às tépalas pelos herbívoros. Por essa razão, peças florais com maior importância reprodutiva podem ser protegidas por “estruturas de sacrifício”, que evitam que o pistilo e os estames sejam danificados (Zhu et al. 2017). O consumo de tecidos florais requer partes bucais dos animais que são capazes de mastigar, e isto pode ser encontrado em besouros, algumas aves e em poucas espécies de morcegos. Flores que apresentam tecidos florais comestíveis geralmente são robustas e com duração longa. Também é necessário que o visitante seja atraído para longe dos óvulos, para que estas estruturas não sejam consumidas juntamente com outras partes florais. Bons exemplos de espécies de planta que apresentam partes florais como recurso para polinizadores são *Acca sellowiana* (Myrtaceae) (Sazima & Sazima 2007), *Calceolaria uniflora* (Scrophulariaceae) (Sérsic e Cocucci 1996), *Myrrhinium atropurpureum* (Myrtaceae) (Roitman et al. 1997) e várias espécies de Annonaceae (Saunders 2012). Portanto, os nectários sem a produção de néctar devem atrair os polinizadores para próximo do pistilo e evitando que o ovário e o óvulo sejam predados. Os herbívoros podem induzir os nectários a liberar compostos voláteis que atraem os polinizadores e distraem os pilhadores das tépalas (Zhu et al. 2017).

A vascularização do nectário se origina no hipanto em ambos os morfotipos florais de *Ocotea minarum*, um fato que apoia a interpretação de que são emergências secretoras de néctar não homólogas a nenhum órgão (Kasapligil 1951; Rohwer 1993, 1994). Entretanto, os nectários em *Ocotea minarum* apresentam estrutura muito diferente das espécies de gênero.

Espécies de *Ocotea* possuem nectários coberto por epiderme papilar com tricomas secretores unicelulares e próximo a base, a epiderme é levemente papilosa e produz compostos fenólicos (Souza & Moscheta 1999; Silva et al. 2024). Além do mais, quando o nectário secreta néctar, a região subepidérmica consiste em parênquima nectarífero contendo células com citoplasma denso e um grande núcleo, que reagem positivamente a lipídios, proteínas e polissacarídeos neutros e o parênquima subnectário é abundantemente vascularizado (Silva et al. 2024).

A presença de flores sem néctar em plantas nectaríferas é um fenômeno comum em Angiospermas (Bailey et al., 2006; Wu et al., 2019; Thakar et al. 2003). Entretanto, a frequência e distribuição de flores sem néctar em populações naturais, e a transição de flores nectaríferas para flores sem néctar são pouco conhecidas. A variação na produção de néctar pode afetar a estabilidade do mutualismo, uma vez que a disponibilidade de recursos energéticos influencia o comportamento de forrageamento dos polinizadores (Guimarães et al., 2018). Flores sem néctar podem produzir compostos voláteis que atraem polinizadores, compensando a ausência de néctar (Guimarães et al., 2018). A evolução das flores sem néctar é influenciada pelos custos da autopolinização e pela abundância de polinizadores. Em cenários com altos custos de autofecundação, uma proporção maior de flores sem néctar pode otimizar o sucesso reprodutivo (Bailey et al., 2006). Modelos matemáticos sugerem que flores sem néctar podem persistir em ecossistemas explorando o comportamento dos polinizadores, levando a um equilíbrio dinâmico entre produtores de néctar e plantas sem néctar (Wu et al., 2019). No caso de *Ocotea minarum* a ausência de produção de néctar nos nectários pode estar sendo compensada pela presença de osmóforos nas tépalas e idioblasto de óleo presentes em todos os verticilos florais.

O sucesso aprimorado da polinização pode impulsionar a evolução de flores sem nectários em plantas que dependem da polinização mediada por vetores. Quando os custos da autofecundação são baixos, uma inflorescência com uma baixa proporção de flores sem néctar é ótima, porque o sucesso da polinização é determinado principalmente pela remoção do pólen. Quando os custos da autofecundação são altos, uma inflorescência com flores principalmente sem néctar é ótima, porque o sucesso da polinização é determinado principalmente pelo cruzamento. Baixas abundâncias de polinizadores levam a uma proporção ótima de diminuição de flores vazias para mitigar a limitação do polinizador (Bailey et al., 2006).

Ocotea como tradicionalmente circunscrito é polifilético e emergiu em sete clados: (1) grupo *Ocotea indecora* (Schott) Mez, (2) grupo *O. aciphylla* (Nees & Mart.) Mez, (3) grupo *O. insularis* (Meisn.) Mez, (4) grupo *O. minarum* Mart. ex Nees, (5) grupo *O. helicterifolia*

(Meisn.) Hemsl., (6) grupo *O. cernua* (Nees) Mez e (7) grupo *Ocotea s. str.* mais *Endlicheria* e *Rhodostemonodaphne* (Penagos-Zuluaga et al., 2021). O grupo *O. minarum* Mart. ex Nees é composto por espécies ginodioicas do gênero, enquanto o grupo *Ocotea s. str.* mais *Endlicheria* e *Rhodostemonodaphne* representa espécies dioicas. Todos os outros grupos apresentam espécies cossexuais (Rohwer 1986; Chanderbali et al. 2001; Penagos-Zuluaga et al., 2021). Portanto, a forte semelhança entre a estrutura dos nectários de espécies de *Ocotea* dioicas (Souza & Moscheta 1999; Silva et al. 2024) e a diferença entre a espécie ginodioica *Ocotea minarum* pode ser um indicativo de sinal filogenético com fortes consequências para o entendimento da evolução do gênero mais complexo do ponto de vista taxonômico da região neotropical (Alves et al., *no prelo*).

Os resultados em *Ocotea minarum* indicaram que árvores com flores pistiladas têm 30 vezes mais chance de uma flor gerar um fruto que em plantas com flores perfeitas. Diversos estudos produzidos para diferentes famílias de plantas têm indicado que em plantas ginodioicas, flores pistiladas produzem significativamente mais sementes que plantas com flores perfeitas (e.g., Sakai & Weller 1991; Shibata & Kudo 2016; Varga 2021; Santos et al. 2024). Esse resultado também foi encontrado para outras espécies de *Ocotea* (Gibson & Diggle 1997; Penagos-Zuluaga 2021). Entretanto, nenhuma evidência de esterilidade dos óvulos das flores perfeitas em *Ocotea minarum* foram observadas.

Embora a ginodioicia tenha sido relacionada como um mecanismo para evitar a autopolinização (Charlesworth & Charlesworth 1978), diversos autores têm postulado que este é um mecanismo para aumentar a eficiência da alocação de recursos (Freeman et al. 1976; Ross 1990; Thomson and Brunet 1990; Spigler & Ashman 2012), potencializando a produção de frutos quando comparado com a cossexualidade (Varga 2021). Embora espécies ginodioicas em Lauraceae sejam autoincompatíveis, esse mecanismo já ocorre em espécies cossexuais (Kubitzki & Kurz 1984). Além do mais, a ampla diferença entre a produção de frutos nos dois morfotipos pode ser irregular, já que indivíduos com flores perfeitas possuem ampla variação na produção de frutos entre estações (Darwin 1877; Penagos-Zuluaga 2020).

5. Conclusão

O estudo confirmou que *Ocotea minarum* é uma espécie ginodioica, devido à morfologia, anatomia e dados de *fruit set*. A diferença na produção de frutos entre indivíduos com flores pistiladas e espécimes com flores perfeitas sugere que está ocorrendo uma maior eficiência na alocação de recursos entre os dois morfotipos florais para otimizar a

reprodução. A ginodioicia pode ser interpretada como um passo intermediário entre a cossexualidade e a dioicia.

6. Referências Bibliográficas

Alves FM & Souza VC (2013) Phylogenetic analysis of the Neotropical genus *Mezilaurus* and reestablishment of *Clinostemon* (Lauraceae). *Taxon* 62: 281-290.

Alves F.M, Assis L.C.S, Quinet A. & Baitello JB (*no prelo*). A key to the Neotropical genera of Lauraceae. *Annals of Missouri Botanical Garden*.

Ashman T-L & Stanton M (1991) Seasonal variation in pollination dynamics of sexually dimorphic *Sidalcea oregana* ssp. *spicata* (Malvaceae). *Ecology* 72: 993-1003.

Ashman TL (1994) Reproductive allocation in hermaphrodite and female plants of *Sidalcea oregana* ssp. *spicata* (Malvaceae) using four currencies. *American Journal of Botany* 81: 433-438.

Assis, L. C. S. Semaphoronts: the Elements of Biological Systematics. In: Williams, D., Schmitt, M., Wheeler, Q.. (Org.). *The Future of Phylogenetic Systematics: The Legacy of Willi Hennig*. 1ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2016, v. , p. 213-229.

Baitello JB, Lorea-Hernández FGL, de Moraes PLR, Esteves R & Marcovino JR (2003) *Lauraceae*. Pp. 149–223. In: Wanderley, M. G. L.; Shepherd, G. J.; Giulietti, A. M. & Melhem, T. S (eds). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. v 3. São Paulo: FAPESP: Rima.

Baker, HG & Baker, I (1975). "Studies of nectar-constitution and pollinator plant coevolution," *In* *Coevolution of Animals and Plants*, eds L. E. Gilbert and P. H. Raven (New York, NY: Columbia University Press), 126–152.

Bawa KS (1980) Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 11: 15-39.

Bailey SF, Hargreaves AL, Hechtenthal SD, Laird RA, Latty T, Reid TG, Jeffrey AT & Tindall R. (2006). Empty flowers as a pollination-enhancement strategy. *Evolutionary Ecology Research*, 9(8):1245-1262.

Bernardello G (2007) A systematic survey of floral nectaries. In: Nicholson SW, Nepi M, Pacini E. (eds.) *Nectaries and nectar*. Dordrecht, Springer. p. 19-128.

Boyle EM (1980) Vascular anatomy of the flower, seed and fruit of *Lindera benzoin*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107: 409-417.

Buzgo M, AS Chanderbali, S Kim, Z Zheng, DG Oppenheimer, P Soltis, D Soltis (2007) Floral developmental morphology of *Persea americana* (avocado, Lauraceae): the oddities of male organ identity. *International Journal of Plant Sciences* 168:261-284.

Cardoso JCF, Viana ML, Matias R, Furtado MT, Caetano APS, Consolaro Hélder & Brito VLG (2018) Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasilica* 32(3): 329-348.

Chanderbali, ASH, van der Werff, H & Renner, RR (2001) The relationships and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Annals of Missouri Botanical Garden* 88: 104–134.

Charlesworth B & Charlesworth D (1978) A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975-997.

Charlesworth D & Charlesworth B (1981) Allocation of resources to male and female functions in hermaphrodites. *Biological Journal of the Linnean Society* 15: 57-74.

Charlesworth D & Charlesworth B (1999) The genetic basis of inbreeding depression. *Genetic Research Cambridge* 74: 329-340.

Carlquist S (1969) Toward acceptable evolutionary interpretations of floral anatomy. *Phytomorphology* 19: 332-362.

Darwin C (1877) The different forms of flowers on plants of the same species. Ed. John Murray, London. 352p.

Dufay M, Champelovier P, Käfer J, Henry JP, Mousset S. & Marais GAB (2014) An angiosperm-wide analysis of the gynodioecy-dioecy pathway. *Annals of Botany*: 1 - 10.

Eckhart VM (1992) Resource compensation and the evolution of gynodioecy in *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Evolution* 46: 1313-1328.

Gibson JP & Diggle PK (1997) Structural analysis of female and hermaphroditic flowers of a gynodioecious tree, *Ocotea tenera* (Lauraceae). *American Journal of Botany* 84: 298-307.

Gibson JP & Diggle PK (1998) Flower development and male sterility in *Ocotea tenera* (Lauraceae): a gynodioecious tropical tree. *Journal of Plant Sciences* 159: 405-417.

González, V.V.; Gorostiague, P.; Ortega-Baes, P; Galati, B.G. & Ferrucci, M.S. 2021. Nectary structure is not related to pollination system in Trichocereae cactus from Northwest Argentina. *An Acad Bras Cienc* 93: e20201401.

Guimarães E, Tunes P, Almeida LD, Stasi, JLC, Dötterl, S, Machado SR. (2018). Nectar Replaced by Volatile Secretion: A Potential New Role for Nectarless Flowers in a Bee-Pollinated Plant Species.. *Frontiers in Plant Science*, 9:1243-1243. doi: 10.3389/FPLS.2018.01243.

HAVSTAD, J. C. ; Assis, L. C. S. ; Rieppel, O. . The semaphorontic view of homology. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, v. 324, p. 578-587, 2015.

Hennig, W. *Phylogenetic systematics* Urbana: University of Illinois Press, 1966.

Hoehna S, Freyman WA, Nolen ZJ, Huelsenbeck JP, May MR, Moore BR. (2019). A Bayesian Approach for Estimating Branch-Specific Speciation and Extinction Rates. *bioRxiv*, 555805-. doi: 10.1101/555805

- Judkevich MD, Salas RM & Gonzalez AM (2022) Anatomy of the floral nectaries of selected species of Gardenieae (Rubiaceae). *Rodriguésia* 73: e01732020.
- Kasaplilgil B (1951) Morphological and ontogenetic studies of *Umbellularia californica* Nutt and *Laurus nobilis* L. University of California Publications in Botany 25: 115–239.
- Kessler D, Diezel C & Baldwin IT (2010) Changing pollinators as a means of escaping herbivores. *Current Biology* 20: 237-242.
- Kostermans AJGH (1957) Lauraceae. *Reinwardtia* 4: 193-256.
- Kubitzki K & Kurz H (1984) Synchronized dichogamy and dioecy in neotropical Lauraceae. *Plant Systematics and Evolution* 147: 253-266.
- Kubitzki K, Rohwer G & Bittrich V (1993) Flowering plants. Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin. 653p.
- Lloyd, DG (1975) The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica* 45: 325-339.
- Lloyd DG & Bawa KS (1984) Modification of the gender of seed plants in varying conditions. *Evol Bioi* 17: 255-338.
- Moon HK & Hong SP (2015) Morphological traits of gynodioecious *Persicaria amphibia* (Polygonaceae). *Phytotaxa* 219: 133-143.
- Nishida S & van der Werff H (2007) Are cuticular characters useful in solving generic relationships of problematic species of Lauraceae? *Taxon* 56: 1229-1237.
- Nishida S & van der Werff H (2011) An evaluation of classification by cuticular characters of the Lauraceae: a comparison to molecular phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 98: 348-358.
- Pancini E, Nepi M & Vesprini JL (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* 238: 7-22.
- Penagos-Zuluaga JC, Queenborough SA & Comita LS (2020) Flowering sex ratios and costs of reproduction in gynodioecious *Ocotea oblonga* (Lauraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 131: 344-355.
- Penagos-Zuluaga JC, van der Werff H, Park B, Eaton DA, Comita LS, Queenborough SA & Donoghue MJ (2021) Resolved phylogenetic relationships in the *Ocotea* complex (Supraocotea) facilitate phylogenetic classification and studies of character evolution. *American Journal of Botany* 108: 664-679.
- Reece PC (1939) The floral anatomy of the avocado. *American Journal of Botany* 26: 429-433.
- Renner, SS (2014) The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an update online database. *American Journal of Botany* 101: 1588-1596.

Rohde R, Rudolph B, Ruthe K, Lorea-Hernández FG, Moraes PLR, Li J & Rohwer JG (2017) Neither *Phoebe* nor *Cinnamomum* - the tetrasporangiate species of *Aiouea* (Lauraceae). *Taxon* 66: 1085-1111.

Rohwer JG (1986) Some aspects of dioecy in *Ocotea* (Lauraceae). *Plant Systematics and Evolution* 152: 47-48.

Rohwer JG (1993a) Lauraceae. *In* The families and genera of vascular plants (K. Kubitzki, J.R. Rohwer & V. Bittrich, eds). Springer-Verlag, Berlin, v. 2, p. 336-391.
_____. 1993b. Lauraceae: *Nectandra*. *Flora Neotropica* 60: 1-332.

Rohwer JG (1994) A note on the evolution of the stamens in the Laurales, with emphasis on the Lauraceae. *Botanica Acta* 107: 103-110.

Rohwer JG & Rudolph B (2005) Jumping genera: the phylogenetic positions of *Cassytha*, *Hypodaphnis*, and *Neocinnamomum* (Lauraceae) based on different analyses of trnK intron sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 92: 153-178.

Roitman GG, Montaldo NH & Medan D (1997) Pollination biology of *Myrrhinium atropurpureum* (Myrtaceae): sweet fleshy petals attract frugivorous birds. *Biotropica* 29(2):162-168.

Saunders RMK (2012) The diversity and evolution of pollination systems in Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 222-244.

Sajo MG, Moraes PLR, Assis LCS, Rudall PJ (2016) Comparative floral anatomy and development in neotropical Lauraceae. *International Journal of Plant Sciences* 177: 579-89.

Sakai AK & Weller SG (1991) Ecological aspects of sex expression in subdioecious *Schiedea globosa* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 78: 1280-1288.

Sakai AK & S Weller SG (1999) Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic Approaches. *In*: Geber MA, Dawson TE & LF Delph (eds.) *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg. Pp. 1-31.

Sastri RLN (1952) Studies in the Lauraceae. I. Floral anatomy of *Cinnamomum iners* Reinw. and *Cassytha filiformis* L. *Journal Indian Botanical Society* 31:240-246.

Sastri RLN (1965) Studies in the Lauraceae: V. comparative morphology of the flower. *Annals of Botany* 29: 39-44.

Sazima I & Sazima M (2007) Petiscos florais: pétalas de *Acacia sellowiana* (Myrtaceae) como fonte alimentar para aves em área urbana no Sul do Brasil. *Biota Neotropica* 7: 308-311.

Schmid R (1972) Floral bundle fusion and vascular conservatism. *Taxon* 21: 429-446.

Sersic AN & Cocucci AA (1996). A Remarkable Case of Ornithophily in *Calceolaria*: Food Bodies as Rewards for a Non-nectarivorous Bird*. *109(2):172-176*. doi: 10.1111/J.1438-8677.1996.TB00558.X

Shibata A & Kudo G (2016) Size-dependent sex allocation and reproductive investment in a gynodioecious shrub. *AoB Planta* plw089; 10.1093/aobpla/plw089.

Silva JB, Leme FM, Franco APSA, Arruda RCO, Schonenberger J & Alves FM (2023) Comparative floral anatomy and evolutionary interpretations of cryptic dioecy in *Ocotea velloziana* (Lauraceae). *Rodriguésia* 75: e01522023.

Simpson BB & Neff JL (1983) Evolution and diversity of floral rewards. In: Jones CE & Little RJ (ed) *Handbook of experimental pollination biology*. Nova Iorque. Pp. 142-159.

Smet W & Rybel B (2016) Genetic and hormonal control of vascular tissue proliferation. *Current Opinion in Plant Biology* 29: 50-56.

Soares D (2017) *Homologia comparativa e transformacional do androceu em Lauraceae* (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. 93p.

Souza LA & Moscheta IS (1999) Morfo-anatomia da flor de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (Lauraceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 21: 343-348.

Souza LA & Moscheta IS (2000) Morfo-anatomia e aspectos da biologia floral de *Nectandra megapota* (Spreng.) Mez (Lauraceae). *Acta Botanica Brasilica* 14: 15-25.

Spiegler R & Ashman TL (2012) Gynodioecy to dioecy: are we there yet?. *Annals of Botany* 109: 531-543.

Stadler T (2013). Recovering speciation and extinction dynamics based on phylogenies. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(6):1203-1219. doi: 10.1111/JEB.12139

Thakar J, Kunte K, Chauhan AK, Watve A & Watve M (2003) Nectarless flowers: ecological correlates and evolutionary stability. *Oecologia*, 136(4):565-570.

Thomson JD & Brunet J (1990) Hypotheses for the evolution of dioecy in seed plants. *Trends in Ecology & Evolution* 5: 11-16.

Trofimov D, Rudolph B & Rohwer JG (2016) Phylogenetic study of the genus *Nectandra* (Lauraceae), and reinstatement of *Damburneya*. *Taxon* 65 (5): 980–996.

Trofimov D, Moraes PLR & Rohwer JG (2019) Towards a phylogenetic classification of the *Ocotea* complex (Lauraceae): classification principles and reinstatement of *Mespilodaphne*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 190: 25–50.

Trofimov D & Rohwer JG (2020) Towards a phylogenetic classification of the *Ocotea* complex (Lauraceae): an analysis with emphasis on the Old World taxa and description of the new genus *Kuloa*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 202: 35–44.

Trofimov D, Cadar D, Schmidt-Chanasit J, Moraes PLR & Rohwer JG (2022) A comparative analysis of complete chloroplast genomes of seven *Ocotea* species (Lauraceae) confirms low sequence divergence within the *Ocotea* complex. *Scientific Reports* 12: 1120.

Varga S (2021) Female advantage in gynodioecious plants: a meta analysis focused on seed quality. *Plant Biology* 23: 695-701.

van der Werff H (1991) A key to the genera of *Lauraceae* in the new world. *Annals of Missouri Botanical Garden* 78 (2):377-387.

Wu H, Sun S & Wang Y (2019) Bifurcations in a pollination-mutualism system with nectarless flowers. *13(11):0*

Zeng G, Liu B, Ferguson DK, Rohwer JG, Yang Y (2017) Floral Structure and ontogeny of *Syndiclis* (Lauraceae). *PlosOne* 12 (10):e0186358.

Zhang B & Claßen-Bockhoff R (2019) Sex-differential reproduction success and selection on floral traits in gynodioecious *Salvia pratensis*. *BMC Plant Biology* 19:375.

Zhu YR, Yang M, Jana CV, Armbruster WS, Wan T & Gong YB (2017) Feeding the enemy: loss of nectar and nectaries to herbivores reduces tepal damage and increases pollinator attraction in *Iris bulleyana*. *The Royal Society* 13.