



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



FENOLOGIA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE ESPÉCIES DE *PIPER* (PIPERACEAE) EM FLORESTA ESTACIONAL SEMIDECÍDUA: ASPECTOS ECOLÓGICOS E FILOGENÉTICOS

ADRIANO VALENTIN DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração Morfologia e Diversidade Vegetal.

**BOTUCATU – SP
2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

FENOLOGIA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DE ESPÉCIES DE
PIPER (PIPERACEAE) EM FLORESTA ESTACIONAL
SEMIDECÍDUA: ASPECTOS ECOLÓGICOS E FILOGENÉTICOS

ADRIANO VALENTIN DA SILVA

Prof.^a Dr.^a ELZA MARIA GUIMARÃES SANTOS
ORIENTADORA

Prof. Dr. MARCO ANTÔNIO PORTUGAL LUTTEMBARCK BATALHA
COORIENTADOR

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração Morfologia e Diversidade Vegetal.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Adriano Valentin da.

Fenologia e biologia reprodutiva de espécies de *Piper*
(Piperaceae) em floresta estacional semidecídua : aspectos
ecológicos e filogenéticos / Adriano Valentin da Silva. -
Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Elza Maria Guimarães Santos
Coorientador: Marco Antônio Portugal Luttembarck Batalha
Capes: 20300000

1. Fenologia vegetal. 2. Plantas - Reprodução. 3. Plantas
- Filogenia. 4. Polinização. 5. Piperacea.

Palavras-chave: andromonoiccia; entomofilia; protoginia
incompleta; sinal filogenético.

AGRADECIMENTOS

À UNESP e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica) pela oportunidade de realização do doutorado e pelo apoio logístico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida, que me permitiu pagar as minhas contas em dia e os gastos das atividades de campo.

À Prof.^a Dr.^a Elza Guimarães por aceitar me orientar em uma situação inesperada, pelos ensinamentos ao longo desses quatro anos, em especial sobre o cuidado do uso adequado de termos e de evitar a linguagem finalista, e pela oportunidade de coorientar três trabalhos de conclusão de curso.

Ao Prof. Dr. Marco Batalha pela coorientação, pelos ensinamentos sobre elaboração de projeto e redação científica e pelo suporte nas análises estatísticas.

Aos membros da banca de projeto, Dr. Anselmo Nogueira e Dr. Tadeu de Siqueira Barros, pelas contribuições nessa fase inicial do trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Florestal da UFV pela autorização para realizar meu trabalho de campo na Mata do Paraíso.

Aos funcionários da Mata do Paraíso, principalmente Wanderly, pelo apoio moral nas atividades de campo.

À Elsie Franklin Guimarães e Micheline Carvalho-Silva pela confirmação da identificação das espécies de *Piper*.

Ao Yanjun Du da Academia de Ciências Chinesa pelo apoio na análise de sinal filogenético no capítulo de fenologia.

Ao Hugo de Azevedo Werneck e José Luis Benavides López pela identificação dos visitantes florais.

Às equipes dos herbários BOTU, RB e VIC pelo apoio durante a análise de exsicatas.

Ao herbário UB pelo empréstimo de exsicatas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências e ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias, UNESP – câmpus Botucatu, pelo apoio nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Anselmo Nogueira e Dr.^a Rita de Cássia Sindrônia Maimoni-Rodella, pelas sugestões na primeira versão da tese.

Aos membros da banca de defesa, Dr. Felipe Wanderley Amorim, Dr.^a Milene Faria de Vieira e Dr. Rodolfo Antônio de Figueiredo, pelas valiosas contribuições para a tese.

Aos antigos membros do Laboratório de Ecologia e Evolução das Interações Planta-Animal, que me acolheram tão bem em 2013. O carinho de vocês fez toda a diferença na minha adaptação em Botucatu.

Ao pessoal da salinha da pós e do herbário VIC por permitirem usar sua estrutura e apoio durante os dois anos e meio de trabalho de campo em Viçosa.

À Erika Ono, Priscila Tunes e Vinícius Alves por me aceitarem como coorientador nos seus TCCs; apesar dos trabalhos não estarem vinculados à minha tese, aprendi bastante com essas experiências.

Aos amigos dos tempos de graduação e mestrado, Cris, Dya, Livia, Luana, Márcia, Simone e Van, mesmo com a distância nossa amizade não diminuiu.

Aos companheiros da república Toca Gado em Viçosa pelos papos cabeça e bons momentos de descontração.

Aos novos amigos que fiz em Viçosa, principalmente Dani, Gabi, Guilherme e Ronaldo. A vida sem vocês em Viçosa teria sido bem mais difícil.

À Milene pelos cafés, conversas e conselhos ao longo do doutorado.

Às meninas do LabEco, Bruna, Camila, Marília e Priscila, pelo apoio mesmo a distância.

À Priscila pela revisão de inglês no manuscrito de fenologia.

À Bruna, Camila e Marília pela amizade e pelas sessões de terapia coletiva.

À Dani, Marília e Ronaldo pelo auxílio na observação de visitantes florais durante alguns dias de campo.

À minha família pelo carinho e apoio ao longo de toda minha vida acadêmica!

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
REFERÊNCIAS.....	4
CAPÍTULO 1 - Fenologia reprodutiva de espécies neotropicais de Piper (Piperaceae) em floresta estacional semidecídua: abordagens ecológica e filogenética.....	6
RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS	8
Área de estudo e espécies estudadas	8
Fenologia reprodutiva	9
Estacionalidade e associação com variáveis abióticas	10
Sinal filogenético.....	10
RESULTADOS	11
Fenologia reprodutiva	11
Estacionalidade e associação com variáveis abióticas	11
Sinal filogenético.....	12
DISCUSSÃO	15
REFERÊNCIAS.....	16
MATERIAL SUPLEMENTAR	22
CAPÍTULO 2 - Os polinizadores podem influenciar a diversificação floral em espécies generalistas? Evidências a partir de espécies neotropicais de <i>Piper</i>	23
RESUMO.....	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
Área de estudo e espécies estudadas	25
Sistema de polinização	27
Caracteres florais e dos visitantes florais	28
RESULTADOS	31

Sistema de polinização	31
Caracteres florais e dos visitantes florais	33
DISCUSSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	38
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	43
CAPÍTULO 3 - Espécies neotropicais de <i>Piper</i> : são todas hermafroditas?	50
RESUMO.....	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	52
Área de estudo e espécies estudadas	52
Expressão sexual	52
RESULTADOS	54
DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	60
INFORMAÇÃO SUPORTE.....	63
CAPÍTULO 4 - Dinâmicas de liberação de pólen e exposição estigmática em espécies neotropicais de <i>Piper</i> : um possível padrão para o gênero	67
RESUMO.....	67
INTRODUÇÃO	68
MATERIAL E MÉTODOS	69
RESULTADOS	71
DISCUSSÃO	75
LITERATURA CITADA	77
APÊNDICE	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS	80

RESUMO

Estudamos diferentes aspectos relacionados à biologia reprodutiva de *Piper*, tendo como plano de fundo o parentesco filogenético entre espécies coocorrentes e utilizando diferentes níveis de amostragem, desde a taxocenose até a flor. No capítulo 1, avaliamos a fenologia reprodutiva de 17 espécies de *Piper* em uma floresta estacional semidecídua para verificar se o clima e o parentesco filogenético estão associados às respostas fenológicas dessas espécies coocorrentes. Apenas a floração apresentou sinal filogenético e foi estacional. A frutificação foi influenciada por fatores abióticos, enquanto a floração teve uma influência compartilhada de fatores abióticos e das restrições filogenéticas. Assim, verificamos que mesmo em ambientes estacionais, pode haver influência da filogenia nos eventos reprodutivos. No capítulo 2, avaliamos o sistema de polinização e testamos se os caracteres florais e dos polinizadores estão correlacionados para verificar se os polinizadores podem ter mediado a diversificação floral em espécies fenotipicamente generalistas. As espécies são entomófilas e foram visitadas por 46 espécies de abelhas, besouros, mirídeos e moscas. Portanto, são ecológica e funcionalmente generalistas. Não houve correlação entre os caracteres florais e os dos visitantes florais, o que sugere que os caracteres analisados não representam adaptações aos polinizadores. Outros fatores, p. ex. ambientes-chave, devem estar relacionados com a diversificação do gênero. No capítulo 3, determinamos a expressão sexual das espécies, com enfoque na funcionalidade das flores ao longo da antese, para verificar se existem variações do hermafroditismo, caráter considerado como universal nas espécies neotropicais do gênero. Observamos variações dessa expressão sexual em quase 25% das espécies aqui estudadas. E no capítulo 4, determinamos se existe um padrão de liberação de pólen e exposição estigmática em espécies neotropicais de *Piper*, independentemente dos números de estames e carpelos e da sexualidade da flor. A dinâmica dos eventos florais foi semelhante entre as espécies: a exposição e senescência estigmática ocorreu de forma sequencial e gradual em sentido basípeto e a liberação de pólen foi assíncrona e sequencial. Como as espécies aqui estudadas pertencem a diferentes clados do gênero, essas características devem ser um padrão para as espécies neotropicais de *Piper*.

ABSTRACT

We studied different aspects related to the reproductive biology of *Piper*, having as background the phylogenetic relationship among the species and using different levels of sampling, from the taxocoenosis to the flower. In chapter 1, we evaluated the reproductive phenology of 17 *Piper* species in a semideciduous seasonal forest to verify whether climate and phylogenetic relationship are associated with the phenological responses of these co-occurring species. Only flowering showed phylogenetic signal and was seasonal. Fruiting was influenced by abiotic factors, whereas flowering had a shared influence of abiotic factors and phylogenetic constraints. Thus, even in seasonal environments, there may be an influence of phylogeny on reproductive events. In chapter 2, we evaluated the pollination system and tested whether floral and pollinator characters are correlated to verify whether pollinators may have mediated floral diversification in phenotypically generalist species. The species are entomophilous and were visited by 46 species of bees, beetles, mirids and flies. So they are ecologically and functionally generalist. There was no correlation between floral characters and floral visitors' characters, which suggests that the analyzed characters do not represent adaptations to the pollinators. Other factors, e.g. key environments, should be related to diversification of this genus. In chapter 3, we determined the sexual expression of species, focusing on the functionality of flowers throughout the anthesis, to verify whether there are variations of hermaphroditism, a character considered as universal in the Neotropical species of the genus. We observed variations of this sexual expression in almost 25% of the species studied here. And in chapter 4, we determined whether there is a pattern of pollen release and stigmatic exposure in Neotropical *Piper* species, independently of the number of stamens and carpels, and flower sexuality. The dynamic of floral events was similar among species: the exposure and senescence of stigmas was sequential and gradual in a basipetal direction, and pollen release was asynchronous and sequential. As the analyzed species belong to different clades of the genus, these characteristics should be a pattern for Neotropical *Piper* species.

INTRODUÇÃO GERAL

Piper é um gênero pantropical e possui cerca de 2.000 espécies (Quijano-Abril et al. 2006), mas a maior diversidade de espécies ocorre na região neotropical (Jaramillo e Manos 2001). No Brasil, está representado por 290 espécies (Guimarães et al. 2015) e a Floresta Tropical Atlântica é um dos centros de diversificação e de endemismos do gênero, com cerca de 150 espécies (Jaramillo e Manos 2001, Quijano-Abril et al. 2006).

As espécies desse gênero são importantes constituintes do sub-bosque de florestas tropicais (Hartshorn e Hammel 1994, Greig 2004) e possuem importância econômica, como *Piper nigrum* (pimenta do reino) que é usada mundialmente como condimento (Greig 2004), e medicinal (Di Stasi et al. 2002, Dyer et al. 2004). Estudos em diversas áreas do conhecimento têm sido realizados utilizando o gênero *Piper*. Em 2004 foi publicado o livro “*Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*”, que aborda diferentes aspectos ecológicos e evolutivos, como as interações mutualísticas com formigas (Letourneau 2004) e morcegos (Fleming 2004), além da ecologia da polinização (Figueiredo e Sazima 2004). Apesar do conhecimento já existente sobre esse grupo de plantas, algumas questões permanecem em aberto, principalmente após os estudos filogenéticos que redefiniram a circunscrição do gênero (Jaramillo e Manos 2001, Jaramillo et al. 2008). Com base nisso, estudamos diferentes aspectos relacionados à biologia reprodutiva de *Piper*, tendo como plano de fundo o parentesco filogenético entre espécies coocorrentes e utilizando diferentes níveis de amostragem, desde a taxocenose até a flor.

No capítulo 1, avaliamos a fenologia reprodutiva de 17 espécies de *Piper* em uma floresta estacional semidecídua para verificar se o clima e o parentesco filogenético estão associadas às respostas fenológicas dessas espécies coocorrentes. No capítulo 2, avaliamos o sistema de polinização e testamos se os caracteres florais e dos polinizadores estão correlacionados para verificar se os polinizadores podem ter mediado a diversificação floral em espécies fenotipicamente generalistas. No capítulo 3, determinamos a expressão sexual das flores e das plantas, com enfoque na funcionalidade das flores ao longo da antese, para verificar se existem variações do hermafroditismo, caráter considerado como universal nas espécies neotropicais do gênero. E no capítulo 4, determinamos se existe um padrão de liberação de pólen e exposição estigmática em espécies neotropicais de *Piper*, independentemente dos números de estames e carpelos e da sexualidade da flor.

REFERÊNCIAS

- Di Stasi, L.C., Hiruma-Lima, C.A., Mariot, A., Portilho, W.G., Reis, M.S. 2002. Piperales medicinais. In: Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Di Stasi, L.C., Hiruma-Lima, C.A. (Eds). Editora Unesp: São Paulo. pp. 120-138.
- Dyer, L., Richards, J., Dodson, C. 2004. Isolations, synthesis, and evolutionary ecology of *Piper* amides. In: *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Dyer, L.A., Palmer, A.D.N. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. pp. 117-139.
- Figueiredo, R.A., Sazima, M. 2004. Pollination ecology and resource partitioning in neotropical *Pipers*. In: *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Dyer, L.A., Palmer, A.D.N. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. pp. 33-57.
- Fleming, T.H. 2004. Dispersal ecology of Neotropical *Piper* shrubs and treelets. In: *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Dyer, L.A., Palmer, A.D.N. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. pp. 58-77.
- Guimarães, E.F., Carvalho-Silva, M., Monteiro, D., Medeiros, E.S., Queiroz, G.A. 2015. *Piperaceae*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB190>. Acesso em: 20 nov 2015.
- Greig, N. 2004. Introduction. In: *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Dyer, L.A., Palmer, A.D.N. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. pp. 1-4.
- Hartshorn, G.S., Hammel, B.E. 1994. Vegetation types and floristic patterns. In: *La Selva: ecology and natural history of a neotropical rain forest*. McDade, L.A., Bawa, K.S., Hespdenheide, H.A., Hartshorn, G.S. (Eds). The University of Chicago Press: Chicago. pp 73-89.
- Jaramillo, M.A., Manos, P.S. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* 88: 706-716.
- Jaramillo, M.A., Callejas, R., Davidson, C., Smith, J.F., Stevens, A.C., Tepe, E.J. 2008. A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron *psbJ-petA*. *Systematic Botany* 33: 647-660.
- Letourneau, D.K. 2004. Mutualism, anthiherbivore, and trophic cascades: *Piper* ant-plants as a mesocosm for experimentation. In: *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Dyer, L.A., Palmer, A.D.N. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. pp. 5-32.

Quijano-Abril, M.A., Callejas-Posada, R., Miranda-Esquivel, D.R. 2006. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography* 33: 1266-1278.

CAPÍTULO 1

Fenologia reprodutiva de espécies neotropicais de *Piper* (Piperaceae) em floresta estacional semidecídua: abordagens ecológica e filogenética

Resumo

As respostas fenológicas das plantas podem ser moduladas por fatores abióticos e bióticos, bem como pelas relações filogenéticas. Baseado nisso, avaliamos a influência de fatores abióticos e das restrições filogenéticas nas fenofases reprodutivas de 17 espécies coocorrentes de *Piper*. Conduzimos este estudo em uma floresta estacional semidecídua no sudeste do Brasil, registrando a presença de flores e frutos ao longo de 12 meses. Analisamos a influência de variáveis abióticas (temperatura, precipitação e comprimento do dia) e da filogenia nas respostas fenológicas. Além disso, testamos se a presença de botões florais latentes influenciou a floração e a frutificação. Ambas as fenofases foram classificadas como contínuas, com pico de atividade na estação chuvosa ou início da estação seca. A antese floral ocorreu mais cedo em espécies com botões florais latentes do que em espécies sem essas estruturas, o que pode ser uma estratégia de escape ao estresse hídrico. Apenas a floração apresentou sinal filogenético e foi estacional. A frutificação foi influenciada por fatores abióticos, enquanto a floração teve uma influência compartilhada de fatores abióticos e das restrições filogenéticas. Assim, nossos resultados indicam que mesmo em ambientes estacionais, pode haver influência da filogenia nos eventos reprodutivos.

* Manuscrito submetido para a revista “*The Science of Nature*”.

Introdução

Em florestas tropicais sazonais, as fenofases reprodutivas das plantas são moduladas pelas variações da precipitação e da temperatura (Stevenson et al. 2008; Rubim et al. 2010). Nesse bioma na América Central e do Sul, os picos de floração geralmente ocorrem no final da estação seca ou no início da estação chuvosa, enquanto que os picos de frutificação ocorrem na estação seca (Daubenmire 1972; Morellato 2010). A estacionalidade das fenofases é uma característica marcante dessas florestas (Daubenmire 1972; Morellato et al. 1989; Stranghetti e Ranga 1997). De fato, a variação estacional de fatores abióticos, especialmente a disponibilidade de água (van Schaik et al. 1993), pode ser responsável pela modulação da atividade fenológica das plantas (Rathcke e Lacey 1985; Fenner 1998).

Além de fatores abióticos, que podem atuar sobre a comunidade como um todo, espécies relacionadas compartilham restrições filogenéticas semelhantes, o que pode limitar suas respostas aos fatores abióticos. Como consequência, essas espécies tendem a ter padrões fenológicos semelhantes (Fenner 1998; Pau et al. 2011). A existência de sinal filogenético em caracteres fenológicos tem sido demonstrada por vários métodos e em diferentes escalas, como floras regionais (Boulter et al. 2006; Davies et al. 2013; Du et al. 2015), floras locais (Wright e Calderon 1995; Bawa et al. 2003; Stevenson et al. 2008) ou táxons específicos (Debussche et al. 2004; Staggemeier et al. 2010).

Floração e frutificação anuais foram os padrões mais comuns observados em espécies de *Piper* ocorrendo em distintas formações (Valentin-Silva e Vieira 2015 e referências nele contidas). No entanto, as respostas fenológicas podem diferir entre espécies que ocupam diferentes habitats, tais como clareiras, bordas da floresta e sub-bosques (Fleming 1985; Figueiredo e Sazima 2004; Thies e Kalko 2004). Além disso, alguns desses estudos avaliaram a influência de fatores bióticos, como polinizadores e dispersores de sementes (Fleming 1985; Thies e Kalko 2004) e fatores abióticos, como o clima (Valentin-Silva e Vieira 2015), sobre as respostas fenológicas de espécies coocorrentes. No entanto, para nosso conhecimento, a influência de fatores filogenéticos sobre as respostas fenológicas de espécies coocorrentes de *Piper* ainda não foi investigada.

Além disso, alguns estudos mostraram que espécies de *Piper* podem ter inflorescências latentes por até 12 meses (Marquis 1988; Valentin-Silva e Vieira 2015): as inflorescências são produzidas ao longo do ano, mas a antese das flores é restrita a determinado período. Essa resposta fenológica pode ser uma estratégia de escape ao estresse hídrico (Martins e Batalha 2011) e pode influenciar a ocorrência das fenofases subsequentes, ou seja, flores em antese e a produção de frutos.

Objetivamos determinar se as variáveis abióticas e o parentesco filogenético estavam associados às respostas fenológicas de espécies coocorrentes de *Piper*. Adicionalmente, testamos se a presença de botões florais latentes estava associada aos períodos de floração e de frutificação. Primeiramente, esperamos que os picos das fenofases reprodutivas fossem associados às variáveis abióticas, ocorrendo em períodos com valores mais altos de temperatura, precipitação e comprimento do dia. Em segundo lugar, esperamos encontrar sinal filogenético nas fenofases reprodutivas devido à inércia evolutiva (Burt 2001). Finalmente, esperamos que a floração ou a frutificação em espécies com botões florais latentes ocorra mais cedo do que nas espécies sem essas estruturas.

Material e métodos

Área de estudo e espécies estudadas

Realizamos o estudo de abril de 2014 até março de 2015 na ‘Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso’ (daqui em diante, ‘Mata do Paraíso’), reserva florestal localizada em Viçosa (20°47'-48'S, 42°50'-52'W), Minas Gerais, com 194 ha de área e altitudes variando de 690 m a 870 m acima do nível do mar. Sua vegetação é classificada como floresta estacional semidecídua montana (Veloso et al. 1991). O clima é do tipo Cwa (mesotérmico com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos), de acordo com a classificação de Köppen (Alvares et al. 2013). A precipitação anual média é 1.221 mm e a temperatura anual média é 19,3°C (média dos dados meteorológicos dos anos de 1961-1990; DNMET 1992). A estação seca é concentrada entre abril e setembro, quando a precipitação mensal é inferior a 60 mm e as temperaturas médias variam de 10°C a 27°C. A estação chuvosa vai de outubro a março, quando a precipitação mensal é maior do que 100 mm e as temperaturas médias variam de 16°C a 30°C. Houve estacionalidade de precipitação e temperatura durante o período de estudo.

Registramos 17 espécies de *Piper* na área de estudo (Tabela 1), que são perenes. Depositamos material testemunho no herbário BOTU, Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista, Botucatu (números 32.172 a 32.201). Nossa amostragem incluiu apenas indivíduos que atingiram a fase reprodutiva, utilizando como critério de seleção a presença de estruturas reprodutivas (inflorescências com botões florais, flores ou frutos) ou a presença de cicatrizes de inflorescências de episódios reprodutivos anteriores (Valentin-Silva e Vieira 2015). Para as espécies com 15 ou menos indivíduos, amostramos todos eles; para as espécies com mais de 15 indivíduos, sorteamos 15 dentre todas as plantas

marcadas para avaliar sua fenologia (Tabela 1), quantidade sugerida como suficiente para estudos fenológicos (Fournier e Charpantier 1975; Morellato et al. 2010a). Amostramos 338 indivíduos no total, dos quais 216 foram utilizados neste estudo.

Tabela 1 Informações sobre as espécies estudadas: hábito, inflorescência e número de plantas amostradas.

Espécies	Hábito	Inflorescência	Número de plantas
<i>Piper aduncum</i> L.	arbusto	espiga	13
<i>P. amplum</i> Kunth	arbusto	espiga	11
<i>P. anisum</i> (Spreng.) Angely	subarbusto	racemo	12
<i>P. arboreum</i> Aubl.	arvoreta	espiga	10
<i>P. caldense</i> C. DC.	arbusto	espiga	15
<i>P. cernuum</i> Vell.	arvoreta	espiga	14
<i>P. chimonanthifolium</i> Kunth	arbusto	espiga	10
<i>P. corcovadensis</i> (Miq.) C. DC.	subarbusto	racemo	15
<i>P. crassinervium</i> Kunth	arbusto	espiga	11
<i>P. gaudichaudianum</i> Kunth	arbusto	espiga	12
<i>P. hispidum</i> Sw.	arbusto	espiga	15
<i>P. lucaeanum</i> Kunth	arbusto	espiga	15
<i>P. malacophyllum</i> (C. Presl) C. DC.	arbusto	espiga	10
<i>P. mollicomum</i> Kunth	arbusto	espiga	8
<i>P. pubisubmarginalum</i> Yunck.	arbusto	espiga	15
<i>P. umbellatum</i> L.	arbusto	umbela de espigas	15
<i>P. vicosanum</i> Yunck.	arbusto	espiga	15

Fenologia reprodutiva

Para a avaliação da fenologia reprodutiva, fizemos observações quinzenais da presença ou ausência de inflorescências com flores em antese (daqui em diante, floração) e com frutos maduros ou imaturos (daqui em diante, frutificação) por planta. A distinção de botões florais e flores em antese é importante para as espécies desse gênero devido à presença de inflorescências com botões florais latentes, conforme observado neste e em outros estudos (Marquis 1988; Valentin-Silva e Vieira 2015). Quando essa separação não existe, o período de disponibilidade de recursos (pólen) para visitantes florais pode ser superestimado.

Calculamos o índice de atividade, porcentagem de espécies e de plantas em uma dada fenofase (Bencke e Morellato 2002). Classificamos a frequência das fenofases em nível da taxocenose (todas as espécies), de acordo com Newstrom et al. (1994), como contínua, subanual ou anual; quando uma fenofase foi anual, também a classificamos de acordo com sua duração como curta (<1 mês), intermediária (1-5 meses) ou estendida (> 5 meses).

Estacionalidade e associação com variáveis abióticas

Avaliamos a estacionalidade das fenofases por meio de estatística circular (Morellato et al. 2010b), utilizando o teste de Rayleigh (Zar 1999). Convertemos os meses em ângulos e calculamos o ângulo médio, data média (para as fenofases com ângulo médio significativo) e comprimento do vetor. Consideramos o resultado como significativo quando $p < 0,01$ e $r > 0,5$ (Morellato et al. 2010b). Fizemos essa análise considerando todas as espécies. Além disso, separamos as espécies em dois grupos (espécies com botões florais latentes e espécies sem botões florais latentes) com o objetivo de verificar se as respostas fenológicas diferiram entre esses dois grupos. Realizamos essas análises utilizando o programa computacional BioEstat (Ayres et al. 2007), considerando os valores quinzenais do número de espécies e de indivíduos em cada fenofase.

Avaliamos se houve associação entre as variáveis abióticas (temperatura média, precipitação e comprimento do dia) e as fenofases, por um período de 0 a 3 meses antes da sua ocorrência. Obtivemos os dados meteorológicos da Estação Meteorológica da Universidade Federal de Viçosa e calculamos as médias dos valores quinzenais da temperatura média e do comprimento do dia e a soma dos valores quinzenais de precipitação. Utilizamos modelos lineares generalizados com distribuição de Poisson e função de ligação logarítmica, selecionando o melhor modelo usando o critério de informação de Akaike (AIC; Crawley 2007). Realizamos essas análises no programa computacional R (R Core Team 2016), considerando os valores quinzenais do número de espécies e indivíduos em cada fenofase como variáveis resposta e temperatura, precipitação e comprimento do dia como variáveis explanatórias.

Sinal filogenético

Para testar se as fenofases apresentam sinal filogenético, primeiramente construímos uma árvore filogenética para as espécies estudadas com base na filogenia do gênero *Piper* proposta por Jaramillo et al. (2008). Três das 17 espécies (*P. lucaeanum*, *P. malacophyllum* e *P. pubisubmarginalum*) não foram incluídas nessa filogenia, portanto sua localização na árvore foi baseada na caracterização morfológica dos clados de *Piper* (Jaramillo et al. 2008) e confirmada com uma taxonomista de Piperaceae. Posteriormente, posicionamos os nós datados de acordo com Smith et al. (2008) e distribuímos os nós não datados uniformemente entre os nós datados (algoritmo de ajuste de comprimento de ramo - BLADJ), usando o programa computacional Phylocom (Webb et al. 2008). Utilizamos o pacote "ape" (Paradis et

al. 2004) do R para visualizar a árvore filogenética. Testamos se as fenofases apresentavam sinal filogenético utilizando o método proposto por Du et al. (2015). Utilizamos o ângulo médio das fenofases para estimar a sua data média de ocorrência. As análises do conservantismo filogenético das fenofases foram realizadas por meio do valor K de Blomberg circular utilizando o pacote "picante" (Kembel et al. 2010) do R adaptado por Du et al. (2015).

Também testamos se a fenologia e as variáveis abióticas estavam relacionadas, controlando ou não o parentesco filogenético. Construímos três matrizes de distância entre os meses: a primeira era uma matriz fenológica, com distâncias euclidianas par a par entre as espécies que estavam florescendo ou frutificando; a segunda era uma matriz climática, com distâncias euclidianas par a par das variáveis abióticas; e a terceira era uma matriz filogenética, com a similaridade filogenética par a par entre as espécies que estavam florescendo ou frutificando. Para construir as duas primeiras matrizes, utilizamos a função "dist" do R. No último caso, utilizamos a função "phylosor" do pacote "picante" (Kembel et al. 2010) do R para calcular os índices de similaridade. Testamos se a fenologia e as variáveis abióticas estavam relacionadas pelo teste de Mantel, usando as duas primeiras matrizes, e se a fenologia e as variáveis abióticas estavam relacionadas controlando o parentesco filogenético pelo teste de Mantel parcial (Manly 2004), usando todas as três matrizes.

Resultados

Fenologia reprodutiva

A floração foi contínua com pico na estação chuvosa (Fig. 1A). A frutificação também foi contínua, mas a maioria das espécies e indivíduos expressaram essa fenofase no final da estação chuvosa e início da estação seca (Fig. 1B). A fenologia de cada espécie de *Piper* está no material suplementar eletrônico.

Estacionalidade e associação com variáveis abióticas

A floração foi estacional, concentrada na estação chuvosa, enquanto a frutificação não foi estacional, apresentando distribuição uniforme ao longo do ano (Tabela 2). Quando analisamos as espécies de acordo com a presença ou ausência de botões florais latentes, houve algumas respostas distintas. A floração foi estacional, mas as espécies com botões florais latentes floresceram no início da estação chuvosa, enquanto as espécies sem botões florais

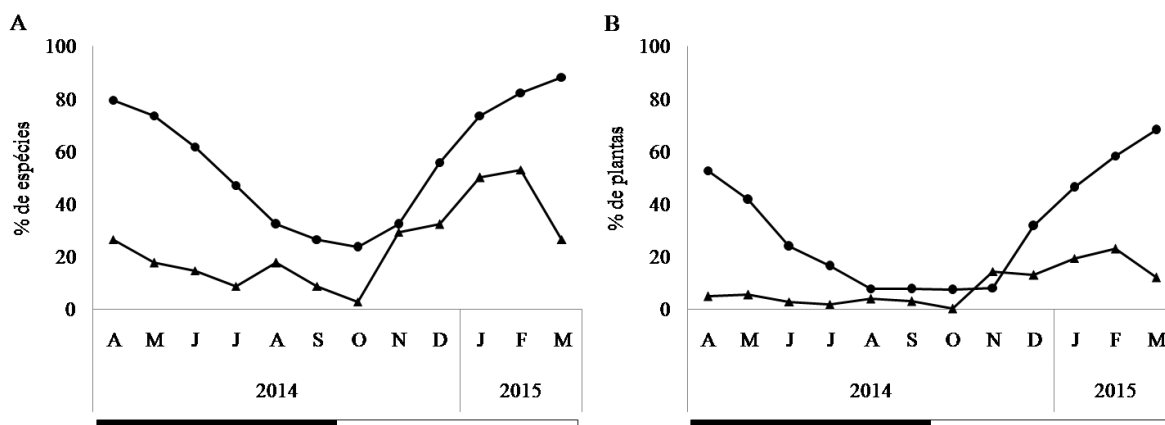


Fig. 1 Porcentagem de espécies (A) e de plantas (B) com flores (▲) e com frutos (●) na taxocenose. ■ = estação seca, □ = estação chuvosa

latentes floresceram no final da estação chuvosa (Tabela 2). A frutificação foi estacional apenas para espécies sem botões florais latentes (Tabela 2). As fenofases estavam associadas por pelo menos uma das variáveis abióticas, no mês de sua ocorrência ou nos meses anteriores (Tabela 3).

Sinal filogenético

Por um lado, a floração apresentou sinal filogenético ($K = 0,170$, $p = 0,0495$), indicando que espécies aparentadas tendem a florescer em períodos semelhantes. A floração e as variáveis abióticas foram significativamente relacionadas ($r = 0,494$, $p = 0,01$), mesmo quando controlamos o parentesco filogenético ($r = 0,467$, $p = 0,02$). Por outro lado, a frutificação não apresentou sinal filogenético ($K = 0,077$, $p = 0,42$). A frutificação e as variáveis abióticas não foram relacionadas ($r = 0,179$, $p = 0,07$), mesmo quando controlamos o parentesco filogenético ($r = 0,207$, $p = 0,06$).

Tabela 2 Resultados dos testes de estatística circular para a ocorrência de estacionalidade nas fenofases reprodutivas de espécies de *Piper*. NE = número de espécies, NI = número de indivíduos

	Floração		Frutificação	
	NE	NI	NE	NI
	Todas as espécies			
Ângulo médio	19,4°			
Data média	20/jan			
Comprimento do vetor médio (<i>r</i>)	0,38	0,52	0,29	0,49
Teste de Rayleigh (<i>p</i>)	<0,01	<0,01*	<0,01	<0,01
	Espécies com botões florais latentes			
Ângulo médio	307,5°	309,7°		
Data média	8/nov	10/nov		
Comprimento do vetor médio (<i>r</i>)	0,58	0,69	0,30	0,47
Teste de Rayleigh (<i>p</i>)	<0,01*	<0,01*	<0,01	<0,01
	Espécies sem botões florais latentes			
Ângulo médio		38,9°		79,3°
Data média		8/fev		22/mar
Comprimento do vetor médio (<i>r</i>)	0,50	0,65	0,32	0,53
Teste de Rayleigh (<i>p</i>)	<0,01	<0,01*	<0,01	<0,01*

*Valores significativos: $p < 0,01$ e $r > 0,5$ (Morellato *et al.* 2010b)

Tabela 3 Modelos utilizados para avaliar a associação entre as variáveis abióticas e as fenofases reprodutivas de espécies de *Piper*. NE = número de espécies; NI = número de indivíduos; AIC = critério de informação de Akaike; temp = temperatura média; precip = precipitação; compd = comprimento do dia

		Modelo cheio	AIC	Modelo selecionado	AIC
Floração	NE	flo.ne ~ temp0+temp1+temp2+temp3+precip0+precip1+precip2+precip3+compd0+compd1+compd2+compd3	108,3	flo.ne ~ compd1	91,0
	NI	flo.ni ~ temp0+temp1+temp2+temp3+precip0+precip1+precip2+precip3+compd0+compd1+compd2+compd3	163,2	flo.ni ~ temp0+temp1+temp3+precip1+precip3+precip2+precip3	158,6
Frutificação	NE	fru.ne ~ temp0+temp1+temp2+temp3+precip0+precip1+precip2+precip3+compd0+compd1+compd2+compd3	123,2	fru.ne ~ temp3+compd2	104,5
	NI	fru.ni ~ temp0+temp1+temp2+temp3+precip0+precip1+precip2+precip3+compd0+compd1+compd2+compd3	173,5	fru.ni ~ temp3+compd0+compd1+compd3	162,7

Discussão

Floração contínua em nível da taxocenose foi também registrada em estudos realizados com espécies de *Piper* em diferentes áreas (Figueiredo e Sazima 2000; Thies e Kalko 2004). O pico de floração durante a estação chuvosa diferiu do que geralmente é registrado para espécies arbóreas em florestas tropicais estacionais (final da estação seca ou no início da estação chuvosa; Daubenmire 1972; Morellato 2010). Essa diferença entre os períodos de pico pode estar relacionada aos fatores abióticos, considerando que essa fenofase teve associação com a temperatura, a precipitação e o comprimento do dia. De fato, o estresse hídrico pode atrasar os períodos de produção de inflorescência em espécies de *Piper* (Wright 1991). Dessa forma, a antese das flores tende a ocorrer quando há maiores valores de precipitação (estação chuvosa), como aqui registrado.

A presença de botões florais latentes influenciou a floração, considerando que a antese floral ocorreu mais cedo, no início da estação chuvosa, do que nas espécies sem botões florais latentes. Esses resultados reforçam a ideia de que a latência floral pode ser uma estratégia de escape ao estresse hídrico (Martins e Batalha 2011; Valentin-Silva e Vieira 2015). Como as inflorescências dessas espécies já estão formadas, a antese da flor pode ocorrer assim que as condições ambientais se tornem favoráveis.

A presença de estacionalidade e sinal filogenético na floração é evidência de que essa fenofase foi agregada ao longo do tempo. Floração agregada também foi observada em espécies de *Piper* na Costa Rica (Fleming 1985) e no Panamá (Wright e Calderon 1995). A agregação dos períodos de floração pode ser explicada pela teoria evolutiva, que prevê que espécies aparentadas apresentam padrões fenológicos semelhantes devido às restrições filogenéticas relacionadas à partilha de um ancestral comum (Fenner 1998; Pau et al. 2011).

Portanto, a floração em *Piper* parece ser influenciada por fatores abióticos e pelo parentesco filogenético. A frequência dessa fenofase pode estar relacionada às restrições filogenéticas, como apontado por Bawa et al. (2003), o que pode explicar o predomínio da frequência anual de floração nas espécies de *Piper* aqui estudadas e também em outros estudos (Opler et al. 1980; Fleming 1985; Figueiredo e Sazima 2004; Thies e Kalko 2004). Por outro lado, o período de ocorrência (estação seca ou chuvosa) e a duração da floração podem ser modulados por fatores abióticos, particularmente a disponibilidade de água e luz em florestas tropicais estacionais (van Schaik et al. 1993; Wright 1996; Zimmerman et al. 2007). Além disso, o comprimento do dia é considerado um dos gatilhos da floração e, por ser um fator abiótico não estocástico, é o melhor preditor de fenofases entre as variáveis ambientais (Stevenson et al. 2008; Rubim et al. 2010). Segundo esses autores, há mais

espécies florescendo em dias longos, semelhante ao observado neste estudo, considerando que o pico de floração ocorreu no verão.

Frutificação contínua de espécies de *Piper* também foi observada por Marinho Filho (1991), Figueiredo e Sazima (2004) e Thies e Kalko (2004). O período de pico dessa fenofase (fim da estação chuvosa e início da estação seca) foi semelhante ao registrado para as espécies arbóreas de florestas estacionais tropicais (Daubenmire 1972; Morellato 2010). Os picos de frutificação ocorrem geralmente durante períodos de baixa atividade fotossintética, como no início da estação seca, ou após períodos de altas taxas de acumulação de reserva, que ocorre no final da estação chuvosa (Jordano 1992).

Em geral, o período de frutificação em espécies de *Piper* é longo (Marinho-Filho 1991; Figueiredo e Sazima 2004; Thies e Kalko 2004). A frutificação contínua em nível da taxocenose permite o fornecimento de frutos ao longo do ano (Snow 1965), o que ajuda a manter as populações de morcegos frugívoros dispersores de sementes de *Piper* (Palmeirim et al. 1989; Fleming 2004; Thies e Kalko 2004), especialmente de *Carollia perspicillata* (Marinho-Filho 1991; Lima e Reis 2004), que ocorre na área de estudo (Nascimento et al. 2013).

A frutificação estava relacionada aos fatores abióticos, como comumente observado em vegetação sob clima estacional. No entanto, a floração teve uma influência compartilhada de fatores abióticos e parentesco filogenético, sugerindo que as espécies de *Piper* possuem nichos reprodutivos filogeneticamente estruturados, isto é, espécies aparentadas florescem quando as condições climáticas são semelhantes (veja Staggemeier et al. 2010). Em estudos em nível de comunidade, esse tipo de resposta pode ser mascarado considerando que existem várias espécies não relacionadas com diferentes respostas fenológicas ocorrendo simultaneamente (Silva et al. 2011). Apesar de nossa amostragem ser restrita a um ano, mostramos que, mesmo em ambientes estacionais, pode haver influência da filogenia nos eventos reprodutivos das plantas.

Referências

- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2013) Köppen's classification map for Brazil. Meteorol Z 22:711-728. doi: 10.1127/0941-2948/2013/0507
- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA (2007) BioEstat – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamiraua, Belém
- Bawa KS, Kang H, Grayum MH (2003) Relationships among time, frequency, and duration of flowering in tropical rain forest trees. Am J Bot 90:877-887. doi: 10.3732/ajb.90.6.877

- Bencke CSC, Morellato LPC (2002) Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia em plantas, sua interpretação e representação. *Rev Bras Bot* 25:269-275. doi: 10.1590/S0100-84042002000300003
- Boulter SL, Kitching RL, Howlett BG (2006) Family, visitors and the weather: patterns of flowering in tropical rain forests of northern Australia. *J Ecol* 94:369-382. doi: 10.1111/j.1365-2745.2005.01084.x
- Burt B (2001) Evolutionary stasis, constraint and other terminology describing evolutionary patterns. *Bot J Linn Soc* 72:509-517. doi: 10.1006/bijl.2000.0512
- Crawley MJ (2007) *The R book*. Wiley, Chichester
- Daubenmire R (1972) Phenology and other characteristics of tropical semi-deciduous forest in north-western Costa Rica. *J Ecol* 60:147-170. doi: 10.2307/2258048
- Davies TJ, Wolkovich EM, Kraft NJB, Salamin N, Allen JM, Ault TR, Betancourt JL, Bolmgren K, Cleland EE, Cook BI, Crimmins TM, Mazer SJ, McCabe GJ, Pau S, Regetz J, Schwartz MD, Travers SE (2013) Phylogenetic conservatism in plant phenology. *J Ecol* 101:1520-1530. doi: 10.1111/1365-2745.12154
- Debussche M, Garnier E, Thompson JD (2004) Exploring the causes of variation in phenology and morphology in Mediterranean geophytes: a genus-wide study of *Cyclamen*. *Bot J Linn Soc* 145:469-484. doi: 10.1111/j.1095-8339.2004.00298.x
- DNMET - Departamento Nacional de Meteorologia (1992) Normas climatológicas (1961-1990). SPI/EMBRAPA, Brasília
- Du Y, Mao L, Queenborough SA, Freckleton RP, Chen B, Ma K (2015) Phylogenetic constraints and trait correlates of flowering phenology in the angiosperm flora of China. *Global Ecol Biogeogr* 24:928-938. doi: 10.1111/geb.12303
- Fenner M (1998) The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspect Plant Ecol* 1:78-91. doi: 10.1078/1433-8319-00053
- Figueiredo RA, Sazima M (2000) Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Ann Bot* 85:455-460. doi: 10.1006/anbo.1999.1087
- Figueiredo RA, Sazima M (2004) Pollination ecology and resource partitioning in neotropical *Pipers*. In: Dyer LA, Palmer ADN (eds) *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Kluwer Academic Publishers, New York, pp 33-57
- Fleming TH (1985) Coexistence of five sympatric *Piper* (Piperaceae) species in a tropical dry forest. *Ecology* 66:688-700. doi: 10.2307/1940530

- Fleming TH (2004) Dispersal ecology of neotropical *Piper* shrubs and treelets. In: Dyer LA, Palmer ADN (eds) *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Kluwer Academic Publishers, New York, pp 58-77
- Fournier LA, Charpantier C (1975) El tamaño de la muestra y la frecuencia de las observaciones en el estudio de las características fenológicas de los árboles tropicales. *Turrialba* 25:45-48.
- Jaramillo MA, Callejas R, Davidson C, Smith JF, Stevens AC, Tepe EJ (2008) A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron *psbJ-petA*. *Syst Bot* 33:647-660. doi: 10.1600/036364408786500244
- Jordano P (1992) Fruits and frugivory. In: Fenner M (ed) *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*. CAB International, Oxford, pp 105-156
- Kembel SW, Cowan PD, Helmus MR, Cornwell WK, Morlon H, Ackerly DD, Blomberg SP, Webb CO (2010) Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26:1463-1464. doi: 10.1093/bioinformatics/btq166
- Lima IP, Reis NR (2004) The availability of Piperaceae and the search for this resource by *Carollia perspicillata* (Linnaeus) (Chiroptera, Phyllostomidae, Carollinae) in the Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool* 21:371-377. doi: 10.1590/S0101-81752004000200035
- Manly BFJ (2004) *Multivariate statistical methods: a primer*. Chapman & Hall, New York
- Marinho-Filho JS (1991) The coexistence of two frugivorous bat species and the phenology of their food plants in Brazil. *J Trop Ecol* 7:59-67. doi: 10.1017/S0266467400005083
- Marquis RJ (1988) Phenological variation in the neotropical understory shrub *Piper arieianum*: causes and consequences. *Ecology* 69:1552-1565. doi: 10.2307/1941653
- Martins FR, Batalha MA (2011) Formas de vida, espectro biológico de Raunkiaer e fisionomia da vegetação. In: Felfili JM, Eisenlohr PV, Melo MMRF, Andrade LA, Meira Neto JAA (eds) *Fitossociologia no Brasil. Métodos e estudos de caso: volume I*. Editora UFV, Viçosa, pp 44-85
- Morellato LPC (2010) South America. In: Schwartz MD (ed) *Phenology: an integrative environmental science*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 75-92
- Morellato LPC, Camargo MGG, d'Eça-Neves FF, Luize BG, Mantavoni A, Hudson IL (2010a) The influence of sampling method, sample size, and frequency of observations on plant phenological patterns and interpretation in tropical forest trees. In: Hudson IL, Keatley MR (eds) *Phenological research: methods for environmental and climate change analysis*. Springer, Dordrecht, pp 99-121

- Morellato LPC, Alberti LF, Hudson IL (2010b) Applications of circular statistics in plant phenology: a case studies approach. In: Hudson IL, Keatley MR (eds) Phenological research: methods for environmental and climate change analysis. Springer, Dordrecht, pp 339-359
- Morellato LPC, Rodrigues RR, Leitão Filho HF, Joly CA (1989) Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semidecídua na Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo. *Rev Bras Bot* 12:85-98.
- Nascimento MC, Stumpp R, Lessa G (2013) Bats (Mammalia: Chiroptera) of Mata do Paraíso research station, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. *Check List* 9:1406-1409.
- Newstrom LE, Frankie GW, Baker HG (1994) A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26:141-159.
- Opler PA, Frankie GW, Baker HG (1980) Comparative phenological studies of treelet and shrub species in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. *J Ecol* 68:167-188. doi: 10.2307/2259250
- Palmeirim JM, Gorchov DL, Stoleson S (1989) Trophic structure of a neotropical frugivore community: is there competition between birds and bats? *Oecologia* 79:403-411.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289-290. doi: 10.1093/bioinformatics/btg412
- Pau S, Wolkovich EM, Cook BI, Davies TJ, Kraft NJB, Bolmgren K, Betancourt JL, Cleland EE (2011) Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. *Global Change Biol* 17:3633-3643. doi: 10.1111/j.1365-2486.2011.02515.x
- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>. Accessed 10 August 2016
- Rathcke B, Lacey EP (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annu Rev Ecol Syst* 16:179-214. doi: 10.1146/annurev.es.16.110185.001143
- Rubim P, Nascimento HEM, Morellato LPC (2010) Variações interanuais na fenologia de uma comunidade arbórea de floresta semidecídua no sudeste do Brasil. *Acta Bot Bras* 24:756-764. doi: 10.1590/S0102-33062010000300019
- Silva IA, Silva DM, Carvalho GH, Batalha MA (2011) Reproductive phenology of Brazilian savannas and riparian forests: environmental and phylogenetic issues. *Ann For Sci* 68:1207-1215. doi: 10.1007/s13595-011-0071-5
- Smith JF, Stevens AC, Tepe EJ, Davidson C (2008) Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic,

- biogeography and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). *Plant Syst Evol* 275:9-30. doi: 10.1007/s00606-008-0056-5
- Snow DW (1965) A possible selective factor in the evolution of fruiting seasons in tropical forest. *Oikos* 15:274-281.
- Staggemeier VG, Diniz-Filho JAF, Morellato LPC (2010) The shared influence of phylogeny and ecology on the reproductive patterns of Myrteae (Myrtaceae). *J Ecol* 98:1409-1421. doi: 10.1111/j.1365-2745.2010.01717.x
- Stevenson PR, Castellanos MC, Cortés AI, Link A (2008) Flowering patterns in a seasonal tropical lowland Forest in western Amazonia. *Biotropica* 40:559-567. doi: 10.1111/j.1744-7429.2008.00417.x
- Stranghetti V, Ranga NT (1997) Phenological aspects of flowering and fruiting at the Ecological Station of Paulo de Faria-SP-Brazil. *Trop Ecol* 38:323-327.
- Thies W, Kalko EKV (2004) Phenology of neotropical pepper plants (Piperaceae) and their association with their main dispersers, two short-tailed fruit bats, *Carollia perspicillata* and *C. castanea* (Phyllostomidae). *Oikos* 104:362-376. doi: 10.1111/j.0030-1299.2004.12747.x
- Valentin-Silva A, Vieira MF (2015) Phenology of two co-occurring *Piper* (Piperaceae) species in Brazil. *Aust J Bot* 63:581-589. doi: 10.1071/BT14332
- van Schaik CP, Terborgh JW, Wright SJ (1993) The phenology of tropical forests: adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annu Rev Ecol and Syst* 24:353-377. doi: 10.1146/annurev.es.24.110193.002033
- Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro
- Webb CO, Ackerly DD, Kembel SW (2008) Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. *Bioinformatics* 24:2098-2100. doi: 10.1093/bioinformatics/btn358
- Wright SJ (1991) Seasonal drought and the phenology of understory shrubs in a tropical moist forest. *Ecology* 72:1643-1657. doi: 10.2307/1940964
- Wright SJ (1996) Phenological patterns of tropical forest plants. In: Mulkey SS, Chazdon RL, Smith AP (eds) *Tropical forest plant ecophysiology*. Chapman & Hall, New York, pp 187-216
- Wright SJ, Calderon O (1995) Phylogenetic patterns among tropical flowering phenologies. *J Ecol* 83:937-948.
- Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey

Zimmerman JK, Wright SJ, Calderón O, Pagan MA, Paton S (2007) Flowering and fruiting phenologies of seasonal and aseasonal neotropical forests: the role of annual changes in irradiance. *J Trop Ecol* 23:231-251. doi: 10.1017/S0266467406003890

Material suplementar eletrônico

Material eletrônico 1 Classificação das fenofases reprodutivas de 17 espécies de *Piper* em floresta estacional semidecídua, Viçosa, Minas Gerais, sudeste do Brasil. Os valores entre parênteses referem-se à duração das fenofases anuais (número de semanas). * Espécies com flores latentes

Espécies	Floração ^A	Frutificação
<i>Piper aduncum</i>	subanual	contínua
<i>P. amplum</i> *	anual curta (2)	anual estendida (24)
<i>P. anisum</i> *	anual curta (2)	anual estendida (24)
<i>P. arboreum</i>	anual intermediária (8)	anual intermediário (18)
<i>P. caldense</i> *	anual intermediária (5)	anual intermediária (14)
<i>P. cernuum</i>	subanual	contínua
<i>P. chimonanthifolium</i> *	anual intermediária (6)	anual intermediária (12)
<i>P. corcovadensis</i> *	anual curta (3)	anual estendida (22)
<i>P. crassinervium</i>	subanual	anual estendida (22)
<i>P. gaudichaudianum</i>	anual intermediária (10)	anual intermediária (16)
<i>P. hispidum</i>	anual intermediária (10)	anual estendida (22)
<i>P. lucaeum</i> * ^B	anual intermediária (5)	anual estendida (32)
<i>P. malacophyllum</i>	anual intermediária (16)	anual estendida (24)
<i>P. mollicomum</i>	anual intermediária (16)	anual estendida (26)
<i>P. pubisubmarginalum</i> *	anual intermediária (5)	anual estendida (34)
<i>P. umbellatum</i>	anual estendida (28)	anual estendida (32)
<i>P. vicosanum</i> *	anual intermediária (8)	anual intermediária (16)

^A As inflorescências com botões florais latentes permaneceram com aproximadamente 0,5 cm de comprimento (exceto *P. pubisubmarginalum* que atingiu 1,5 cm) e somente próximo ao período de antese ocorreu seu alongamento

^B Nessa espécie, as espigas permaneceram protegidas pelo perfilo por cerca de nove meses e só se tornaram visíveis um mês antes da antese. Perfilos tendo espigas com botões florais latentes estavam presentes em todas as plantas analisadas ao longo do ano

CAPÍTULO 2

Os polinizadores podem influenciar a diversificação floral em espécies generalistas?

Evidências a partir de espécies neotropicais de *Piper*

RESUMO

A maioria das angiospermas é polinizada por animais e a diversidade de suas flores é atribuída majoritariamente às pressões seletivas exercidas pelos polinizadores. Alguns caracteres florais são considerados como inovações chave para o aumento da taxa de diversificação. Por outro lado, acredita-se que os polinizadores desempenham papel pouco importante na diversificação de espécies que são fenotipicamente generalistas. Avaliamos o sistema de polinização em 17 espécies de *Piper* e testamos se há correlação entre os caracteres florais e os dos polinizadores. Adicionalmente, testamos se os caracteres florais possuem sinal filogenético e se a evolução desses caracteres está correlacionada. As espécies são entomófilas e foram visitadas por 46 espécies de abelhas, besouros, mirídeos e moscas. Portanto, são ecológica e funcionalmente generalistas. Não encontramos evidências para a anemofilia, que já foi relatada para outras espécies do gênero. Apenas o caráter floral ‘quantidade grãos de pólen por antera’ apresentou sinal filogenético. Não houve correlação entre os caracteres florais e os dos visitantes florais, o que sugere que caracteres florais não representam adaptações aos polinizadores. A diversificação em *Piper* pode estar relacionada a ambientes-chave.

Palavras-chave: ambientes-chave, entomofilia, generalização, polinização.

* Manuscrito em elaboração.

INTRODUÇÃO

As angiospermas representam o maior grupo entre as plantas terrestres e, apesar de sua origem recente, é muito diverso morfológica e ecologicamente (Soltis e Soltis 2004). Espécies de angiospermas possuem uma ampla diversidade nos caracteres florais e mecanismos reprodutivos, sendo que espécies aparentadas podem ter diferentes modos de reprodução sexuada e assexuada e sistemas de polinização e reprodutivos contrastantes (Barrett 2008).

Cerca de 90% das angiospermas são polinizadas por insetos e outros animais (Ollerton et al. 2011) e a diversidade de suas flores geralmente é atribuída às pressões seletivas exercidas pelos polinizadores (Fenster et al. 2004). Mudanças de polinizador podem ser acompanhadas pela divergência nos caracteres florais, sendo essa mudança frequente e considerada importante na diversificação de algumas linhagens de angiospermas (Niet e Johnson 2012). Alguns caracteres florais são considerados como inovações-chave associadas ao aumento da taxa de diversificação, como a zigomorfia (Sargent 2004) e o polinário (Yamashiro et al. 2008). Por isso, assume-se que os polinizadores desempenham papel pouco importante na diversificação de espécies que são fenotipicamente generalistas (*sensu* Ollerton et al. 2007); entretanto, essa suposição permanece controversa e ainda pouco estudada (Niet e Johnson 2012).

Piper está entre os cinco gêneros de angiospermas mais ricos em espécies (Greig 2004), com cerca de 2.000 espécies com distribuição pantropical (Quijano-Abril et al. 2006) e com a maior diversidade de espécies na região neotropical (Jaramillo e Manos 2001). Suas flores são morfológicamente similares, aperiartadas e protegidas por uma bráctea (Jaramillo et al. 2008). Apesar disso, existem variações relacionadas tanto com a inflorescência (posição, arranjo, apresentação e comprimento) quanto com a flor (presença ou ausência de pedicelos, forma da bráctea e número de estames e carpelos) (Jaramillo e Manos 2001) que podem estar associadas com diferentes grupos funcionais de polinizadores.

Nesse gênero, prevalece a entomofilia, tendo sido registrados insetos de diferentes ordens atuando como polinizadores, com predomínio de abelhas e moscas (Martin e Gregory 1962, Semple 1974, Fleming 1985, Thomazini e Thomazini 2002, Figueiredo e Sazima 2004, Kikuchi et al. 2007). Como há variação nos grupos funcionais que polinizam essas espécies, esperamos que os caracteres dos polinizadores estejam correlacionados com os caracteres florais, com base na teoria da diversificação floral mediada por polinizadores (Niet e Johnson 2012). Além da entomofilia, também há relato de anemofilia e ambofilia, polinização por vento e insetos (Figueiredo e Sazima 2000). Assim, caso haja espécies ambófilas, esperamos

ausência de correlação entre os caracteres florais dessas espécies e os dos polinizadores bióticos.

Objetivamos avaliar o sistema de polinização em espécies de *Piper*, analisando se há dependência de vetores de pólen bióticos ou abióticos para que ocorra a reprodução sexuada. Também verificamos se há correlação entre os caracteres florais e os dos polinizadores, o que indicaria a existência de acoplamento morfológico e a possível atuação desses vetores bióticos de pólen na diversificação floral (Gómez e Zamora 2006). Adicionalmente, testamos se os caracteres florais possuem sinal filogenético e se a evolução desses caracteres está correlacionada entre si. Dessa forma, poderemos avaliar se esses caracteres florais são susceptíveis à pressão seletiva (Blomberg et al. 2003), por exemplo, dos polinizadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e espécies estudadas

Realizamos o estudo de abril de 2014 a outubro de 2016 na ‘Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso’ (daqui em diante, Mata do Paraíso), situada em Viçosa (20°47'-48'S, 42°50'-52'W), estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Esse local possui 194 ha de área e altitudes variando entre 690 e 870 m. Sua vegetação é classificada como floresta estacional semidecídua montana (Veloso et al. 1991).

Nós registramos 17 espécies de *Piper*, que pertencem a diferentes clados do gênero (Tabela 1). A maioria das espécies é arbusto, com inflorescência do tipo espiga (Tabela 1). Todas as espécies apresentam flores bissexuais e algumas espécies também apresentam flores unissexuais masculinas (capítulo 3). As flores são sésseis e geralmente possuem androceu com quatro estames, gineceu tricarpelar com ovário súpero, unilocular, uniovular, com três estigmas (estilete geralmente ausente) (Tabela 1; Yuncker 1972, 1973). A maioria das espécies floresce durante a estação chuvosa (capítulo 1). Depositamos material testemunho no acervo do Herbário BOTU do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista (números 32.172 a 32.201).

Para amostrar as plantas, utilizamos como critério de inclusão a presença de estruturas reprodutivas (inflorescências com botões florais, flores ou frutos) ou de cicatrizes de inflorescências de episódios reprodutivos anteriores (Valentin-Silva e Vieira 2015). Percorremos cinco transecções existentes na área (cerca de 5 km de extensão) e a vegetação adjacente, marcando as plantas que encontramos. Amostramos 338 plantas (Tabela 1), dentre as quais, posteriormente, sorteamos os indivíduos utilizados em cada análise.

Tabela 1: Informações sobre as espécies estudadas: clado em que está localizada na árvore filogenética, tipos de hábito e de inflorescência, número de estames e estigmas por flor e número de plantas analisadas.

Espécie	Clado	Hábito	Inflorescência	Estames	Estigmas	Número de plantas
<i>Piper aduncum</i> L.	Radula	arbusto	espiga	4	3	18
<i>P. amplum</i> Kunth	Radula	arbusto	espiga	6	3	11
<i>P. anisum</i> (Spreng.) Angely	Otonia	subarbusto	racemo	4	4	12
<i>P. arboreum</i> Aubl.	Macrostachys	arvoreta	espiga	4	3	11
<i>P. caldense</i> C. DC.	Peltobryon	arbusto	espiga	4	3	25
<i>P. cernuum</i> Vell.	Macrostachys	arvoreta	espiga	4	3	18
<i>P. chimonanthifolium</i> Kunth	Radula	arbusto	espiga	4	3	18
<i>P. corcovadensis</i> (Miq.) C. DC.	Otonia	subarbusto	racemo	4	4	38
<i>P. crassinervium</i> Kunth	Radula	arbusto	espiga	4	3	14
<i>P. gaudichaudianum</i> Kunth	Radula	arbusto	espiga	4	3	27
<i>P. hispidum</i> Sw.	Radula	arbusto	espiga	4	3	23
<i>P. lucaeanum</i> Kunth	Schilleria	arbusto	espiga	3	3	25
<i>P. malacophyllum</i> (C. Presl) C. DC.	Radula	arbusto	espiga	4	3	13
<i>P. mollicomum</i> Kunth	Radula	arbusto	espiga	4	3	15
<i>P. pubisubmarginalum</i> Yunck.	Schilleria	arbusto	espiga	3	3	18
<i>P. umbellatum</i> L.	Pothomorphe	arbusto	espigas em umbela	2	3	20
<i>P. vicosanum</i> Yunck.	Radula	arbusto	espiga	4	3	32

Sistema de polinização

Para avaliar a ocorrência de polinização biótica, fizemos observação dos visitantes florais durante cinco dias em cada espécie de *Piper*. Para cada dia de observação, sorteamos um indivíduo que acompanhamos das 7 às 17 h, totalizando um esforço amostral de 850 horas. Capturamos os visitantes com câmara mortífera preparada com acetato de etila e, posteriormente, analisamos seus corpos sob estereomicroscópio para verificar a presença de grãos de pólen, que apresentam ornamentação geralmente granular (Divya et al., 2015; veja também www.paldat.org) e coloração esbranquiçada ou creme-amarelada. Monitoramos o comportamento de visita em observações visuais diretas em campo e também com auxílio de filmagens (85 horas de filmagem). Calculamos a porcentagem de visitas de cada ordem de insetos para cada espécie de planta.

Também avaliamos a ocorrência de polinização abiótica mediada pelo vento (teste de anemofilia). Para tanto, sorteamos 10 plantas/espécie (em *P. arboreum* e *P. cernuum* utilizamos cinco plantas) e isolamos uma inflorescência com flores pré-antese em cada planta com sacos de tecido que possuem trama que permite a passagem de pólen, mas impede a entrada de vetores de polinização bióticos. Avaliamos se as flores senesceram ou se iniciaram a frutificação uma semana após o fim da antese; depois de 30 dias coletamos os frutos.

Além do teste de isolamento de inflorescência, realizamos experimento para testar a capacidade do vento de retirar grãos de pólen das anteras e transportá-los. Sorteamos três plantas/espécie e coletamos uma inflorescência/planta que apresentava anteras prestes a liberar pólen. Em laboratório, utilizamos ventilador (velocidade média de 3 m/s) para simular a ação do vento. Posicionamos pedaços de plástico adesivo com área de 20 cm X 20 cm a 30, 60 e 120 cm da inflorescência. Quando as anteras estavam liberando pólen, colocamos a inflorescência em posição similar à observada em campo e ligamos o ventilador por cerca de um minuto próximo da inflorescência. Posteriormente, analisamos os pedaços de plástico adesivo sob estereomicroscópio para verificar a presença de pólen. Em seguida, recortamos porções, na base, no meio e no ápice, de cada pedaço de plástico adesivo com tamanho de uma lâmina (7,5 cm X 2,5 cm) e analisamos em microscópio de luz.

Como os grãos de pólen em espécies de *Piper* geralmente formam grumos sobre a antera após sua liberação (Semple 1974, Valentin-Silva et al. 2015, capítulo 4), utilizamos sudan IV para testar a presença de lipídeos (Pearse 1972) em pólen fresco, um dos principais constituintes do cimento polínico (“pollenkitt”; Pacini e Hesse 2005). Sorteamos três plantas/espécie, nas quais coletamos uma inflorescência que possuía flores prestes a liberar pólen. No laboratório, coletamos o pólen das anteras que estavam deiscendo, colocamos sobre uma gota de sudan IV e observamos as lâminas em microscópio de luz.

Além do teste de isolamento de inflorescências para verificar a ocorrência de anemofilia, realizamos outros três testes para verificar a dependência de vetores de polinização para a reprodução sexuada: 1) formação de frutos sem a interferência de um vetor de pólen (FI = frutificação independente de vetores); 2) formação de frutos em flores polinizadas manualmente (AM = autopolinização manual); e 3) formação de frutos em flores expostas às condições ambientais locais, utilizado como controle (PA = polinização aberta). Utilizamos a inflorescência como unidade amostral, segundo métodos propostos por Sage et al. (2005). Nas mesmas plantas sorteadas para o teste de anemofilia ($n = 10$ plantas/espécie), marcamos outras três inflorescências/planta, uma para cada teste. Nos testes de FI e AM nós isolamos as inflorescências com flores em pré-antese com sacos de papel impermeável para impedir a passagem de pólen, transportado por vetores de polinização bióticos e abióticos; nós não emasculamos as flores devido ao seu tamanho reduzido. As inflorescências permaneceram isoladas durante todo o período de antese. No caso da AM, retiramos os sacos durante o período de liberação de pólen para autopolinizar as flores, utilizando uma haste flexível com pontas de algodão. Após esse procedimento, isolamos as inflorescências novamente. Em algumas inflorescências foi necessário fazer a autopolinização manual em mais de um dia para conseguir distribuir pólen em todas as flores, devido à assincronia na deiscência das anteras (veja capítulo 4). No teste de PA, mantivemos as inflorescências expostas à ação dos vetores bióticos e abióticos de polinização pelo mesmo período.

Avaliamos as inflorescências desses testes uma semana após o fim da antese e coletamos os frutos depois de 30 dias. Para calcular a porcentagem de frutificação, contamos os números de flores ($n = 10$ inflorescências, 10 plantas) e de frutos formados em cada teste de polinização sob estereomicroscópio. Para tanto, utilizamos uma porção com comprimento igual a um terço do comprimento total da inflorescência. Posteriormente, extrapolamos o valor do número de flores e de frutos encontrados nessa porção para o comprimento total da inflorescência. Avaliamos os resultados dos testes de polinização (incluindo o de anemofilia), após transformação dos dados (arco-seno), por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando o programa computacional R (R Core Team 2016).

Caracteres florais e dos visitantes florais

Utilizamos características das inflorescências/flores e dos polinizadores para avaliar se existe correlação entre a morfologia floral e a dos visitantes florais. Os caracteres escolhidos estão relacionados à atratividade ou ao acoplamento entre a flor e o polinizador. Os caracteres relacionados às inflorescências foram arranjo e comprimento. Os caracteres relacionados às flores foram comprimento do pedicelo e do estilete, área estigmática e quantidade de grãos de

pólen por antera. Os caracteres avaliados nos visitantes florais foram comprimento do corpo e das pernas (posterior, mediana e anterior), área abdominal e torácica.

As inflorescências de *Piper* possuem dois tipos de arranjo: solitárias ou organizadas em umbela. Para transformar esse caráter em uma variável quantitativa, atribuímos valor 1 para as espécies com inflorescência solitária. Quando houve inflorescências em umbela, sorteamos 10 plantas e em cada planta sorteamos uma umbela, na qual contamos o número de inflorescências. Utilizamos a média do número de inflorescências/umbela para representar o arranjo. Para avaliar o comprimento das inflorescências, sorteamos 10 plantas/espécie e em cada planta medimos o comprimento em uma inflorescência que tinha flores no fim da antese com paquímetro digital ou fita métrica, para representar o comprimento máximo da inflorescência.

Para medir o comprimento do pedicelo e do estilete e a área estigmática nas flores, o comprimento do corpo e das pernas e a área abdominal e do tórax nos visitantes florais, fizemos fotografias em estereomicroscópio com câmera digital acoplada. Processamos as imagens no programa LAS v. 3.8, no qual fizemos as medidas de comprimento e de área da superfície das estruturas analisadas. Coletamos 10 inflorescências/espécie (n = 10 plantas) para medir os caracteres florais. No caso da área estigmática, utilizamos flores no fim da fase pistilada (todas as espécies apresentaram protoginia incompleta; veja capítulo 4) como padrão. Para quantificar os caracteres dos visitantes florais, capturamos até 10 indivíduos de cada espécie.

Para a quantificação de pólen, utilizamos técnica adaptada de Roulston (2005). Coletamos 10 inflorescências/espécie (n = 10 plantas) que tinham flores em antese. Em cada inflorescência, retiramos uma antera indeiscente que maceramos em um tubo com 0,5 mL de água destilada. Homogeneizamos a amostra em agitador por 30 segundos e retiramos uma alíquota de 0,01 mL e contamos o número de grãos de pólen com auxílio de lâmina quadriculada em microscópio de luz. Extrapolamos o valor encontrado na alíquota para a amostra inicial.

Analisamos os caracteres por meio do teste de Mantel parcial (Manly 2004). Para tanto, construímos três matrizes de distâncias. A primeira foi uma matriz com os caracteres florais, com distâncias euclidianas par a par entre as espécies. Como os caracteres ‘arranjo da inflorescência’, ‘comprimento do pedicelo’ e ‘comprimento do estilete’ foram pouco informativos por apresentarem pouca variação entre espécies, nós retiramos esses caracteres da análise. Portanto, utilizamos na análise os valores médios dos caracteres ‘comprimento da inflorescência’, ‘área estigmática’ e ‘quantidade de grãos de pólen por antera’, que padronizamos pela amplitude, utilizando a função ‘decostand’ do pacote ‘vegan’ (Dixon

2003) do R. A segunda foi uma matriz com os caracteres dos visitantes florais, com distâncias euclidianas par a par entre as espécies. Como todos os caracteres estavam altamente correlacionados, utilizamos apenas o valor médio do ‘comprimento do corpo’ para representar a dimensão dos polinizadores, que ponderamos pela proporção de visitas em cada espécie de *Piper*.

A terceira matriz foi uma matriz com as distâncias cogenéticas para controlar o parentesco filogenético, pois espécies aparentadas não representam amostras independentes na análise estatística (Felsenstein 1985). Para tanto, construímos uma árvore filogenética com as espécies estudadas baseada na árvore filogenética proposta para o gênero (Jaramillo et al. 2008). Tivemos que posicionar três espécies (*P. lucaeanum*, *P. malacophyllum* e *P. pubisubmarginalum*) na árvore com base na caracterização morfológica dos clados (Jaramillo et al. 2008), pois essas espécies não foram amostradas no estudo filogenético do gênero. Posteriormente, posicionamos os nós datados de acordo com Smith et al. (2008a). Distribuímos os nós não datados uniformemente entre os nós datados utilizando o algoritmo ‘bladj’ (Branch Length Adjustment) do programa computacional Phylocom (Webb et al. 2008). Utilizamos o pacote ‘ape’ (Paradis et al. 2004) do R para visualizar a árvore filogenética. Construímos a matriz de distâncias cogenéticas entre as espécies de *Piper* estudadas usando a função ‘cophenetic.phylo’ do pacote ‘ape’ do R a partir da nossa árvore filogenética.

Além disso, testamos se os caracteres florais apresentavam sinal filogenético. Analisamos os caracteres ‘comprimento da inflorescência’, ‘área estigmática’ e ‘quantidade de grãos de pólen por antera’ por meio da função ‘multiPhyloSignal’ do pacote ‘picante’ (Kembel et al. 2010) do R, utilizando a árvore filogenética construída para as espécies estudadas. Se não há sinal filogenético, o valor de K é próximo de 1; se $K > 1$, os caracteres são conservados; se $K < 1$, os caracteres são convergentes (Ackerly 2009). Também testamos se as evoluções de pares de caracteres florais estavam correlacionadas, ou seja, se a mudança de valor de um caráter implica em uma mudança no valor do outro ou se as evoluções estão desacopladas. Para tanto, estimamos o estado de caráter ancestral usando a função ‘ace’ do pacote ‘ape’ do R. Posteriormente, construímos matrizes de distâncias par a par com os valores dos caracteres florais e verificamos se houve correlação por meio do teste de Mantel (Manly 2004).

RESULTADOS

Sistema de polinização

As espécies foram visitadas por insetos das ordens Coleoptera (besouros, oito espécies), Diptera (moscas, 13 espécies), Hemiptera (mirídeo, uma espécie) e Hymenoptera (abelhas, 24 espécies) (Tabela 2, material suplementar 1). Esses insetos buscavam pólen nas flores, único recurso disponível registrado durante as observações. Registramos visitas desde as 7h até as 17h, mas a maioria das visitas ocorreu no fim da manhã ou início da tarde. As flores das espécies mais visitadas geralmente apresentavam apenas pólen residual nas anteras ou até mesmo as tecas vazias no fim do período de observação. Por outro lado, foi comum observar a permanência de grumos de pólen sobre as anteras de um dia para o outro nas flores das espécies menos visitadas. As abelhas foram os visitantes mais abundantes e frequentes (Tabela 2, material suplementar 2).

Todos os grupos de visitantes florais apresentaram comportamento similar: os insetos pousavam nas inflorescências, percorrendo parte ou toda sua extensão, e geralmente visitavam mais de uma inflorescência por planta. As abelhas do gênero *Melipona*, observadas visitando as inflorescências de *P. caldense* e *P. chimonanthifolium*, realizavam vibrações enquanto percorriam as espigas. Das 46 espécies de insetos, 28 (61%, sendo 10,7% de Coleoptera, 17,9% de Diptera, 3,6% de Hemiptera e 67,8% de Hymenoptera) visitaram mais de uma espécie de *Piper* (material suplementar 1) e o comportamento de visita foi similar nas flores de todas as espécies visitadas. Por outro lado, o tempo de visita variou entre os grupos de insetos. As abelhas e as moscas realizaram visitas rápidas, geralmente de até 30 segundos, e os besouros e os mirídeos realizaram visitas mais lentas (algumas visitas duravam mais de uma hora) com pouca movimentação ao longo da inflorescência. Também houve variação no tempo de visita ao longo do dia. As abelhas e moscas permaneciam mais tempo nas inflorescências no período da manhã; no período da tarde as visitas duravam poucos segundos e esses insetos visitavam mais inflorescências na mesma planta.

Observamos a presença de pólen nas pernas e na parte ventral do tórax e do abdômen em quase todas as espécies de insetos coletados, exceto nas moscas observadas visitando as espigas de *P. umbellatum* e nos mirídeos. Observamos pólen aderido em pelo menos uma dessas partes do corpo dos polinizadores e, visualmente, as abelhas apresentaram maior quantidade de pólen aderido ao corpo do que as moscas e os besouros.

Em relação à polinização abiótica, a anemofilia não foi corroborada na maioria das espécies, considerando que não houve diferença estatística entre esse teste e os de independência de vetores e autopolinização manual (Tabela 3). Apenas em *P. cernuum*

Tabela 2: Números de espécies e de visitas dos visitantes florais, agrupados por ordem, observados em 17 espécies de *Piper* em floresta estacional semidecídua, Viçosa, Brasil.

Espécie	Visitantes	Número de espécies	Número total de visitas (%)
<i>Piper aduncum</i>	Diptera	2	13 (1,3)
	Hymenoptera	8	959 (98,7)
<i>P. amplum</i>	Coleoptera	2	22 (4,5)
	Hemiptera	1	11 (2,3)
	Hymenoptera	8	454 (93,2)
<i>P. anisum</i>	Coleoptera	1	22 (12,4)
	Diptera	2	2 (1,1)
	Hemiptera	1	5 (2,8)
<i>P. arboreum</i>	Hymenoptera	7	148 (83,6)
	Coleoptera	3	15 (65,2)
	Diptera	1	2 (8,7)
<i>P. caldense</i>	Hymenoptera	3	6 (26,1)
	Diptera	3	69 (19,0)
	Hymenoptera	7	294 (81,0)
<i>P. cernuum</i>	Coleoptera	1	20 (100,0)
<i>P. chimonanthifoilum</i>	Diptera	2	19 (1,4)
	Hymenoptera	9	1.301 (98,6)
<i>P. corcovadensis</i>	Coleoptera	1	37 (11,4)
	Hymenoptera	6	287 (88,6)
<i>P. crassinervium</i>	Coleoptera	1	6 (1,7)
	Diptera	2	4 (1,1)
	Hymenoptera	5	353 (97,2)
<i>P. gaudichaudianum</i>	Coleoptera	2	12 (0,9)
	Diptera	4	37 (2,9)
	Hymenoptera	10	1.234 (96,2)
<i>P. hispidum</i>	Coleoptera	3	22 (2,0)
	Diptera	5	69 (6,3)
	Hemiptera	1	3 (0,3)
	Hymenoptera	8	1.000 (91,4)
<i>P. lucaeum</i>	Coleoptera	2	21 (8,2)
	Diptera	2	42 (16,4)
	Hemiptera	1	2 (0,8)
	Hymenoptera	5	191 (74,6)
<i>P. malacophyllum</i>	Diptera	2	3 (0,6)
	Hymenoptera	5	464 (99,4)
<i>P. mollicomum</i>	Diptera	3	23 (4,2)
	Hemiptera	1	4 (0,7)
	Hymenoptera	6	525 (95,1)
<i>P. pubisubmarginalum</i>	Diptera	3	23 (8,0)
	Hemiptera	1	1 (0,3)
	Hymenoptera	9	263 (91,6)
<i>P. umbellatum</i>	Diptera	2	5 (100,0)
<i>P. vicosanum</i>	Coleoptera	2	12 (4,0)

Diptera	3	16 (5,4)
Hemiptera	1	13 (4,4)
Hymenoptera	7	256 (86,2)

observamos uma tendência no aumento de frutos formados no teste de anemofilia, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas (Tabela 3). No experimento de circulação de ar forçada, observamos grumos de pólen aderidos à lâmina apenas em duas espécies (*P. caldense* e *P. chimonanthifolium*) e somente a 30 cm das inflorescências.

No teste com sudan IV, o contorno dos grãos de pólen apresentou coloração avermelhada enquanto que o interior, coloração amarelada. Também observamos a formação de gotículas na superfície do pólen, que foram mais evidentes nas espécies *P. aduncum*, *P. arboreum*, *P. malacophyllum* e *P. mollicomum*, que apresentaram pólen de cor creme a amarelada, do que nas demais espécies, que apresentaram pólen de cor esbranquiçada.

Registramos nove espécies que foram independentes de vetores para a reprodução sexuada e oito que foram dependentes de vetores (Tabela 3). Das espécies dependentes de vetores, *P. corcovadensis* e *P. lucaeanum* apresentaram baixa frutificação nos testes de FI e AM (Tabela 3). *Piper amplum*, *P. cernuum* e *P. crassinervium*, apesar de não dependerem de vetores para se reproduzir, apresentaram maior frutificação no teste de polinização aberta do que no de isolamento das inflorescências dos vetores de pólen (Tabela 3). Nas demais espécies não houve diferença estatística entre nenhum dos tratamentos (Tabela 3).

Caracteres florais e dos visitantes florais

Não houve correlação entre os caracteres florais e os caracteres dos visitantes florais ($r = -0,0024$, $p = 0,392$). O caráter floral ‘quantidade de grãos de pólen por antera’ apresentou sinal filogenético ($K = 0,483$, $p = 0,007$), indicando que espécies pouco aparentadas são similares fenotipicamente; por outro lado, os caracteres ‘comprimento da inflorescência’ ($K = 0,068$, $p = 0,564$) e ‘área estigmática’ ($K = 0,0110$, $p = 0,342$) não apresentaram sinal filogenético. Também não houve correlação entre as evoluções dos caracteres florais analisados ($p > 0,6$). Os dados dos caracteres florais e dos visitantes florais estão, respectivamente, nos materiais suplementares 3 e 4.

DISCUSSÃO

As espécies estudadas são entomófilas, sistema de polinização mais comum em espécies neotropicais de *Piper* (Semple 1974, Fleming 1985, Figueiredo e Sazima 2000, Thomazini e Thomazini 2002, Figueiredo e Sazima 2004, Kikuchi et al. 2007), incluindo a

Tabela 3: Número de flores por inflorescência e porcentagem de frutificação dos testes de polinização (média \pm desvio padrão) em 17 espécies de *Piper* em floresta estacional semidecídua, Viçosa, Brasil. FI = frutificação independente de vetores, AM = autopolinização manual, AN = anemofilia, PA = polinização aberta.

Espécie	Flores	Tratamentos*			
		FI	AM	AN	PA
<i>Piper aduncum</i>	1.734,8 \pm 234,3	65,5 \pm 9,8a	60,0 \pm 10,8a	59,7 \pm 6,8a	57,8 \pm 8,8a
<i>P. amplum</i>	437,6 \pm 27,8	50,7 \pm 27,5a	65,2 \pm 24,9a	58,3 \pm 21,2a	85,3 \pm 13,1b
<i>P. anisum</i>	238,5 \pm 39,3	0,0	0,0	0,0	47,4 \pm 19,2
<i>P. arboreum</i>	729,0 \pm 114,5	50,1 \pm 22,6a	63,5 \pm 12,6a	53,5 \pm 18,2a	70,0 \pm 8,7a
<i>P. caldense</i>	252,8 \pm 27,2	0,0	0,0	0,0	72,2 \pm 29,6
<i>P. cernuum</i>	3.488,0 \pm 376,7	43,2 \pm 5,1a	53,6 \pm 3,0ab	63,4 \pm 6,9bc	73,0 \pm 5,1c
<i>P. chimonanthifolium</i>	1.027,6 \pm 164,4	0,0	0,0	0,0	48,7 \pm 22,0
<i>P. corcovadensis</i>	221,8 \pm 36,9	0,0	0,1 \pm 0,3	0,6 \pm 1,7	48,5 \pm 29,9
<i>P. crassinervium</i>	471,3 \pm 44,9	13,1 \pm 12,1a	28,8 \pm 22,7ab	12,9 \pm 12,3a	33,7 \pm 8,6b
<i>P. gaudichaudianum</i>	2.046,9 \pm 250,5	0,0	0,0	0,0	74,0 \pm 17,6
<i>P. hispidum</i>	1.955,5 \pm 394,2	0,0	0,0	0,0	68,5 \pm 12,4
<i>P. lucaeum</i>	1.071,3 \pm 115,6	1,8 \pm 5,7	0,0	0,0	85,1 \pm 21,5
<i>P. malacophyllum</i>	1.634,4 \pm 179,3	70,6 \pm 14,7a	64,2 \pm 30,5a	71,5 \pm 27,3a	88,6 \pm 9,6a
<i>P. mollicomum</i>	1.565,5 \pm 343,9	41,7 \pm 22,3a	52,9 \pm 34,4a	41,2 \pm 25,4a	69,9 \pm 14,8a
<i>P. pubisubmarginalum</i>	1.100,8 \pm 162,4	0,0	0,0	0,0	8,5 \pm 4,3
<i>P. umbellatum</i>	2.279,4 \pm 233,3	76,7 \pm 22,6a	80,3 \pm 16,6a	72,2 \pm 19,5a	85,7 \pm 11,8a
<i>P. vicosanum</i>	463,7 \pm 71,3	88,9 \pm 16,4a	90,8 \pm 12,0a	93,4 \pm 7,7a	85,9 \pm 13,2a

*Médias seguidas por mesma letra em cada linha não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

espécie paleotropical *P. nigrum* L. (Martin e Gregory 1962). Segundo esses autores, as abelhas e as moscas são os polinizadores mais comuns, entretanto também há relatos de besouros (Semple 1974, Figueiredo e Sazima 2004), como aqui registrado; entretanto, os besouros apresentaram mais espécies e realizaram mais visitas do que nos estudos citados anteriormente. Portanto, as espécies de *Piper* são ecológica e funcionalmente generalistas (*sensu* Ollerton et al. 2007).

Dentre os polinizadores, as abelhas apresentaram o maior número de espécies e de visitas. A maioria das espécies é de abelhas sociais e poliléticas e, por isso, exploram recursos florais de diversas espécies vegetais (Minussi e Alves-Santos 2007, Nogueira e Augusto 2007). As moscas e os besouros realizaram menos visitas nas espécies de *Piper* do que as abelhas.

As espécies dependentes de vetores de pólen podem ser consideradas como exclusivamente entomófilas devido à ausência de frutificação sem um vetor biótico de transferência de pólen, semelhante ao observado por Figueiredo e Sazima (2000) em três espécies de *Piper*. Por outro lado, devido ao comportamento de visitação, a transferência de pólen entre flores da mesma planta pode levar à oclusão estigmática, reduzindo o sucesso reprodutivo ao interferir na fertilização potencial, decorrente da polinização cruzada (Jong e Klinkhamer 1994), o que pode explicar a baixa frutificação em *P. pubisubmarginalum*.

A ausência de diferença entre os testes de frutificação independente de vetores e autopolinização manual indicou que essas espécies independem de vetores para que ocorra a autopolinização em suas flores, podendo haver autopolinização autônoma *sensu* Lloyd e Schoen (1992) ou apomixia (Whitton et al. 2008, Hörandl e Hojsgaard 2012). Este mecanismo reprodutivo foi observado apenas na espécie paleotropical *P. nigrum* (Gentry 1955, Sasikumar et al. 1992). Estudos com marcadores moleculares serão realizados para verificar se esse mecanismo ocorre em espécies neotropicais de *Piper*. Além disso, como essas espécies são visitadas por diferentes insetos que visitam mais de uma inflorescência por planta, é provável que ocorra geitonogamia (Lloyd e Schoen 1992). Por isso, o componente feminino do sucesso reprodutivo pode ser negativamente afetado (depressão endogâmica; Jong e Klinkhamer 1994, Barrett e Harder 1996).

As espécies independentes de vetores de pólen que apresentaram maior frutificação no teste de polinização aberta do que no teste de frutificação independente de vetores possuem sistema reprodutivo misto, pois, além da autogamia (ou apomixia), também são polinizadas por insetos. Esse tipo de sistema reprodutivo pode ter sido selecionado em espécies zoófilas em momentos em que vetores bióticos de pólen estiveram escassos ou eram imprevisíveis (Barrett 2002). Esse tipo de mudança, da alogamia para sistema reprodutivo misto, ocorre

mais frequentemente em espécies com polinização biótica do que abiótica (Goodwillie et al. 2005).

Além de insetos, também há relatos do vento como vetor de pólen em espécies de *Piper* (Martin e Gregory 1962, Figueiredo e Sazima 2000). Entretanto, esse tipo de polinização não foi verificado nas espécies do presente estudo, tanto no teste com inflorescências ensacadas quanto no experimento de circulação de ar forçada. Outras características observadas evidenciam maior adequação à entomofilia em espécies de *Piper*: 1) visitação abundante de insetos na maioria das espécies (Thomazini e Thomazini 2002, Figueiredo e Sazima 2004); 2) posição dos verticilos reprodutivos (estigmas proximamente circundados pelos estames) (Valentin-Silva et al. 2015), o que evidencia que essas estruturas não são tão expostas como em espécies anemófilas; além da 3) presença de grumos de pólen sobre as anteras de um dia para o outro (Semple 1974, Valentin-Silva et al. 2015, capítulo 4), evidenciando a presença de alguma substância aglutinante, o que pode diminuir a capacidade de transporte pelo vento.

A presença de cimento polínico, indicada pelo teste com sudan IV, não havia sido descrita para espécies de *Piper*. Outras características como a formação de grumos de pólen sobre as anteras após sua liberação e a possibilidade de permanência desses grumos de um dia para o outro (Semple 1974, Valentin-Silva et al. 2015, capítulo 4) reforçaram a ideia de que existe alguma substância aglutinante dos grãos de pólen. A variação na cor do pólen, de esbranquiçada a creme-amarelada, também foi observada por Figueiredo e Sazima (2000). Essa diferença de cor pode estar relacionada com a quantidade e composição do cimento polínico (Dobson 1989). Espécies com sistemas de polinização distintos diferem quanto às características do pólen, incluindo a presença, localização e quantidade de cimento polínico (Pacini e Hesse 2005).

As flores das espécies de *Piper* podem se enquadrar na classificação de espécies fenotipicamente generalistas (*sensu* Ollerton et al. 2007), pois não apresentaram nenhuma adaptação relacionada a algum grupo funcional de polinizadores. Jaramillo e Manos (2001) sugeriram que a estrutura da inflorescência deve influenciar mais a polinização em espécies de *Piper* do que a estrutura da flor. Entretanto, não observamos correlação dos caracteres dos insetos nem com caracteres da inflorescência nem com os da flor. Além disso, as espécies de *Piper* também são ecológica e funcionalmente generalistas (*sensu* Ollerton et al. 2007), ou seja, são polinizadas por insetos de diferentes espécies, gêneros, bem como de diferentes ordens. Jaramillo e Manos (2001) propuseram que espécies com inflorescências congestas (clados *Macrostachys*, *Pothomorphe* e *Radula*; Jaramillo et al. 2008) poderiam ter uma guilda de polinizadores mais especializada do que espécies com inflorescências laxas

(clados Enckea, Ottonia, Peltobryon e Schilleria; Jaramillo et al. 2008), o que não foi evidenciado pelos nossos dados.

Como as flores de *Piper* são visitadas por insetos de diferentes grupos funcionais, os polinizadores poderiam exercer pressões seletivas em várias direções, influenciando a evolução dos caracteres florais (Fenster et al 2004, Ollerton et al. 2009). Por outro lado, a ausência de correlação entre os caracteres florais e os dos insetos sugere que os caracteres florais analisados podem ser convergentes na árvore filogenética. Esse padrão foi observado apenas para o caráter floral ‘quantidade de grãos de pólen por antera’. A ausência de sinal filogenético nos outros caracteres florais, ‘comprimento da inflorescência’ e ‘área estigmática’, sugere que esses caracteres não representam adaptações aos polinizadores. Resultado semelhante foi observado em espécies de *Iochroma* (Solanaceae) para os caracteres florais ‘comprimento da corola’ e ‘cor da flor’ (Smith et al. 2008b). Dessa forma, as diferenças morfológicas observadas nas inflorescências e flores de *Piper* parecem não ser suficientes para que ocorra a formação de guildas de polinização entre as espécies desse gênero. *Piper* teve origem no Cretáceo, mas sua diversificação em nível de espécie ocorreu mais tarde, durante o Terciário (Smith et al. 2008a). Portanto, esse tempo evolutivo pode ter sido insuficiente para o aumento da diversificação morfológica (Gentry 1989).

As evidências descritas anteriormente mostram que os polinizadores exerceram pouca influência na diversificação de *Piper*, representando um sistema de generalização não adaptativa (*sensu* Gómez e Zamora 2006). Outros fatores também podem estar relacionados com a diversificação floral, como a pressão seletiva de agentes bióticos não polinizadores e agentes abióticos (Strauss e Whittall 2006). A diversificação em *Piper* pode ter sido dirigida pela adaptação a habitats únicos e pela evolução do hábito não arbustivo (Marquis 2004). De fato, a distribuição da maioria das espécies de *Piper* é limitada a pequenas áreas ou a poucos locais, com poucas espécies de distribuição ampla (Marquis 2004, Quijano-Abril et al. 2006). Nesse caso, a diversificação do gênero pode estar relacionada a ambientes-chave (Johnson 2006). Por exemplo, espécies de *Trianaeopiper* (gênero polifilético, cujas espécies estão atualmente circunscritas em *Piper*) são pequenos arbustos que possuem inflorescências axilares, característica rara em Piperaceae, e são endêmicas da região de Chocó no noroeste da América do Sul (Jaramillo e Manos 2001, Jaramillo e Callejas 2004). Essa estrutura das inflorescências é resultado da redução dos ramos que produz a aparência anã, característica correlacionada com ambientes sombreados, como o sub-bosque de florestas tropicais úmidas (Jaramillo e Callejas 2004).

As espécies de *Piper* apresentaram sistema de polinização generalista (ecológica e funcionalmente) e são entomófilas. A diversificação do gênero parece que foi recente e não

houve correlação entre os caracteres florais e os dos polinizadores. Esses resultados ampliam o conjunto de informações sobre diversificação mediada por polinizadores e corroboram a ideia de que a diversificação de espécies fenotipicamente generalistas é pouco influenciada pelas pressões seletivas exercidas pelos polinizadores.

REFERÊNCIAS

- Ackerly, D. 2009. Conservatism and diversification of plant functional traits: evolutionary rates versus phylogenetic signal. *PNAS* 106: 19699-19706.
- Barrett, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H. 2008. Major evolutionary transitions in flowering plant reproduction: an overview. *International Journal of Plant Sciences* 169: 1-5.
- Barrett, S.C.H., Harder, L.D. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 73-79.
- Blomberg, S.P., Garland, T., Ives, R. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57: 717-745.
- Divya, K.G., Nair, M.C., Shaji, P.K., Nair, P.K.K. 2015. Pollen morphology of pepper cultivars and their wild allies from southern western Ghats, Kerala, India. *International Journal of Advanced Research* 3: 344-353.
- Dixon, P. 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 14: 927-930.
- Dobson, H.E.M. 1988. Survey of pollen and pollenkitt lipids – chemical cues to flower visitors. *American Journal of Botany* 75: 170-182.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* 125: 1-15.
- Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R., Thomson, J.D. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 375-403.
- Figueiredo, R.A., Sazima, M. 2000. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany* 85: 455-460.
- Figueiredo, R.A., Sazima, M. 2004. Pollination ecology and resource partitioning in Neotropical *Pipers*. In: *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Dyer, L.A., Palmer, A.D.N. (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. pp. 33-57.

- Fleming, T.H. 1985. Coexistence of five sympatric *Piper* (Piperaceae) species in a tropical dry forest. *Ecology* 66: 688-700.
- Gentry, H.S. 1955. Apomixis in black pepper and jojoba? *Journal of Heredity* 46:8.
- Gentry, A.H. 1989. Speciation in tropical forests. In: *Tropical forests, botanical dynamics, speciation and diversity*. Holm-Nielsen, L.B., Nielsen, I.C., Balslev, H. (Eds.). Academic Press: London. pp. 113-134.
- Gómez, J.M., Zamora, R. 2006 Ecological factors that promote the evolution of generalization in pollination systems. In: *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. Waser, N.M., Ollerton, J. (Eds.). The University of Chicago Press: Chicago. pp. 145-166.
- Goodwillie, C., Kalisz, S., Eckert, C.G. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 47-79.
- Greig, N. 2004. Introduction. In: *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Dyer, L.A., Palmer, A.D.N. (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. pp. 1-4.
- Hörandl, E., Hojsgaard, D. 2012. The evolution of apomixis in angiosperms: a reappraisal. *Plant Biosystems* 146: 681-693.
- Jaramillo, M.A., Callejas, R. 2004. A reappraisal of *Trianaeopiper* Trelease: convergence of dwarf habitat in some *Piper* species of the Chocó. *Taxon* 53: 269-278.
- Jaramillo, M.A., Manos, P.S. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* 88: 706-716.
- Jaramillo, M., Callejas, R., Davidson, C., Smith, J.F., Stevens, A.C., Tepe, E. 2008. A phylogeny of the tropical Genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron *psbJ-petA*. *Systematic Botany* 33: 647-660.
- Jong, T.J., Klinkhamer, P.G.L. 1994. Plant size and reproductive success through female and male function. *Journal of Ecology* 82: 399-402.
- Johnson, S.D. 2006. Pollinator-driven speciation in plants. In: *Ecology and evolution of flowers*. Harder, L.D., Barrett, S.C.H. (Eds.). Oxford University Press: New York. pp. 295-310.
- Kembel, S.W., Cowan, P.D., Helmus, M.R., Cornwell, W.K., Morlon, H., Ackerly, D.D., Blomberg, S.P., Webb, C.O. 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26: 1463-1464.

- Kikuchi, D.W., Lasso, L., Dalling, J. W., Nadav, N. 2007. Pollinators and pollen dispersal of *Piper dilatatum* (Piperaceae) on Barro Colorado Island, Panama. *Journal of Tropical Ecology* 23: 603-606.
- Lloyd, D.G. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences* 153: 370-380.
- Lloyd, D.G., Schoen, D.J. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153: 358-369.
- Manly, B.F.J. 2004. *Multivariate statistical methods: a primer*. Chapman & Hall: New York.
- Marquis, R.J. 2004. Biogeography of Neotropical *Piper*. In: *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution*. Dyer, L.A., Palmer, A.D.N. (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. pp. 78-96.
- Martin, F.W., Gregory, L.E. 1962. Mode of pollination and factors affecting fruit set in *Piper nigrum* L. in Puerto Rico. *Crop Science* 2: 295-299.
- Minussi, L.C., Alves-Santos, I. 2007. Abelhas nativas versus *Apis mellifera* Linnaeus, espécie exótica (Hymenoptera: Apidae). *Bioscience Journal* 23: 58-62.
- Niet, T., Johnson, S.D. 2012. Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution* 27: 353-361.
- Nogueira, F.H., Augusto, S.C. 2007. Amplitude de nicho e similaridade no uso de recursos florais por abelhas eussociais em uma área de Cerrado. *Bioscience Journal* 23: 45-51.
- Ollerton, J., Killick, A., Lamborn, E., Watts, S., Whiston, M. 2007. Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower. *Taxon* 56: 717-728.
- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
- Ollerton, J., Alarcón, R., Waser, N.M., Price, M.V., Watts, S., Cranmer, L., Hingston, A., Peter, C.I., Rotenberry, J. 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* 103: 1471-1480.
- Pacini, E., Hesse, M. 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. *Flora* 200: 399-415.
- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K. 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290
- Pearse, A.G.E. 1972. *Histochemistry: theoretical and applied*. Vol. 2. 3^a ed. The Williams & Wilkins Company: Baltimore.
- Quijano-Abril, M.A., Callejas-Posada, R., Miranda-Esquivel, D. R. 2006. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography* 33: 1266-1278.

- R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.) Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 10 ago 2016.
- Roulston T. 2005. Pollen as a reward. In: Practical pollination biology. Dafni, A., Kevan, P.G., Husband, B.C. (Eds.). Enviroquest: Cambridge. pp. 236-241.
- Sage, T.L., Husband, B.C., Routley, M.B. 2005. Intrinsic attributes of the breeding system. In: Practical pollination biology. Dafni, A., Kevan, P.G., Husband, B.C. (Eds.). Enviroquest: Cambridge. pp. 30-55.
- Sargent, R.D. 2004. Floral symmetry affects speciation rates in angiosperms. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 271: 603-608.
- Sasikumar, B., George, J.K., Ravindran, P.N. 1992. Breeding behaviour of black pepper. Indian Journal of Genetics 52: 17-21.
- Semple, K.S. 1974. Pollination in Piperaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 61: 868-871.
- Smith, J.F., Stevens, A.C., Tepe, E.J., Davidson, C. 2008a. Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeography and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). Plant Systematics and Evolution 275: 9-30.
- Smith, S.D., Ané, C., Baum, D.A. 2008b. The role of pollinator shifts in the floral diversification of *Iochroma* (Solanaceae). Evolution 62: 793-806.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. 2004. The origin and diversification of angiosperms. American Journal of Botany 91: 1614-1626.
- Strauss, S.Y., Whittall, J.B. 2006. Non-pollinator agents of selection on floral traits. In: Ecology and evolution of flowers. Harder, L.D., Barrett, S.C.H. (Eds.). Oxford University Press: New York. pp. 120-138.
- Thomazini, M.J., Thomazini, A.P.B.W. 2002. Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em inflorescências de *Piper hispidinervum* (C.DC.). Neotropical Entomology 31: 27-34.
- Valentin-Silva, A., Vieira, M.F. 2015. Phenology of two co-occurring *Piper* (Piperaceae) species in Brazil. Australian Journal of Botany 63: 581-589.
- Valentin-Silva, A., Coelho, V.P.M., Ventrella, M.C., Vieira, M.F. 2015. Timing of pollen release and stigma receptivity period of *Piper vicosanum* (Piperaceae): new insights into sexual reproduction of the genus. American Journal of Botany 102: 626-633.
- Veloso, H.P., Rangel Filho, A.L.R., Lima, J.C.A. 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE: Rio de Janeiro.

- Webb, C.O., Ackerly, D.D., Kembel, S.W. 2008. Phylocom: software for the analysis of phylogenetic community structure and trait evolution. *Bioinformatics* 24: 2098-2100.
- Whitton, J., Sears, C.J., Baack, E.J., Otto, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169: 169-182.
- Yamashiro, T., Yamashiro, A., Yokoyama, J., Maki, M. 2008. Morphological aspects and phylogenetic analyses of pollination systems in the *Tylophora-Vincetoxicum* complex (Apocynaceae-Asclepiadoideae) in Japan. *Biological Journal of the Linnean Society* 93: 325-341.
- Yuncker, T.G. 1972. The Piperaceae of Brazil - I *Piper* group I, II, III, IV. *Hoehnea* 2: 19-366.
- Yuncker, T.G. 1973. The Piperaceae of Brazil II: *Piper*: Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorrhachis*. *Hoehnea* 3: 29-284.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar 1: Visitantes florais observados em 17 espécies de *Piper* em floresta estacional semidecídua, Viçosa, Brasil.

Ordem	Família	Subfamília	Tribo	Espécie	Espécie de <i>Piper</i> *							
Coleoptera	Chrysomelidae	Bruchinae		Morfoespécie 1	cer, his, luc							
			Morfoespécie 2	amp, arb, gau, his, vic								
			Morfoespécie 3	cor								
			Morfoespécie 4	arb, cra, gau, his								
			Morfoespécie 5	amp								
			Morfoespécie 6	luc								
			Morfoespécie 7	vic								
			Diptera	Curculionidae			Morfoespécie 1	arb				
						Stratiomyidae		Morfoespécie 1	gau			
							Syrphidae		Morfoespécie 1	arb, luc, pub, vic		
									Morfoespécie 2	his		
									Morfoespécie 3	his		
									Morfoespécie 4	adu, cra, gau, his, mal, mol, umb, vic		
									Morfoespécie 5	pub		
									Syrphinae	Bacchini	<i>Baccha</i> sp.	chi
										Syrphini	<i>Ocyptamus</i> sp. 1	ani, cal, chi, cra, his, luc, pub, vic
											<i>Ocyptamus</i> sp. 2	cal, mol, umb
			<i>Ocyptamus</i> sp. 3	cal								
			<i>Ocyptamus</i> sp. 4	adu, ani, gau, his, mol, pub								
			<i>Ocyptamus</i> sp. 5	gau								
			<i>Ocyptamus</i> sp. 6	mal								
Hemiptera	Miridae			Morfoespécie 1	amp, ani, his, luc, mol, pub, vic							
Hymenoptera	Apidae			Morfoespécie 1	his, luc, mal, mol, pub, vic							
				Morfoespécie 2	cor, pub, vic							
		Apinae	Apini	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	adu, amp, ani, cal, chi, cra, gau, mal, vic							
			Exomalopsini	<i>Exomalopsis</i> sp.	adu							

	Meliponini	<i>Melipona (Eomelipona) bicolor bicolor</i> Lepeletier, 1836	cal, chi
		<i>Melipona (Melipona) quadrifasciata quadrifasciata</i> Lepeletier, 1836	cal, chi
		<i>Melipona (Michmelia) mondury</i> Smith, 1863	cal, chi
		<i>Paratrigona</i> sp.	adu, amp, ani, vic
		<i>Plebeia droryana</i> (Friese, 1900)	cra, gau, his, luc
		<i>Plebeia phrynostoma</i> Moure, 2004	amp, ani, cor, mol, pub, vic
		<i>Plebeia</i> sp.	amp, cor, cra, pub
		<i>Schwarziana quadripunctata</i> (Lepeletier, 1836)	amp, ani, cal, chi, cor, cra, vic
		<i>Tetragona</i> sp.	adu, amp, ani, chi, gau, his, mal, mol, pub
		<i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811)	adu, amp, ani, cal, chi, cor, gau, his, luc, mal, mol, pub, vic
		<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	cal, chi
	Tapinotaspidini	<i>Paratetrapedia</i> sp.	gau
Colletinae	Colletini	<i>Colletes</i> sp.	adu, arb, cor, pub
Halictinae	Augochlorini	<i>Augochlora</i> sp. 1	luc
		<i>Augochlora</i> sp. 2	adu, gau, his
		<i>Augochlora</i> sp. 3	arb
		<i>Augochlorella</i> sp.	his
		<i>Augochloropsis</i> sp.	amp, ani, arb, mol, pub
	Halictini	<i>Dialictus</i> sp.	adu, mal
Megachilinae	Megachilini	<i>Megachile</i> sp.	chi, cra, gau, his, luc, mol, pub

*adu = *Piper aduncum*, amp = *P. amplum*, ani = *P. anisum*, arb = *P. arboreum*, cal = *P. caldense*, cer = *P. cernuum*, chi = *P. chimonanthifolium*, cor = *P. corcovadensis*, cra = *P. crassinervium*, gau = *P. gaudichaudianum*, his = *P. hispidum*, luc = *P. lucaeanum*, mal = *P. malacophyllum*, mol = *P. mollicomum*, pub = *P. pubisubmarginalum*, umb = *P. umbellatum*, vic = *P. vicosanum*.

Material suplementar 2: Proporção de visita dos visitantes florais observados em 17 espécies de *Piper* em floresta estacional semidecídua, Viçosa, Brasil. adu = *Piper aduncum*, amp = *P. amplum*, ani = *P. anisum*, arb = *P. arboreum*, cal = *P. caldense*, cer = *P. cernuum*, chi = *P. chimonanthifolium*, cor = *P. corcovadensis*, cra = *P. crassinervium*, gau = *P. gaudichaudianum*, his = *P. hispidum*, luc = *P. lucaeanum*, mal = *P. malacophyllum*, mol = *P. mollicomum*, pub = *P. pubisubmarginalum*, umb = *P. umbellatum*, vic = *P. vicosanum*.

Visitantes florais	adu	amp	ani	arb	cal	cer	chi	cor	cra	gau	his	luc	mal	mol	pub	umb	vic
COLEOPTERA																	
Chrysomelidae 1	0	0	0,124	0	0	1,000	0	0	0	0	0,001	0,063	0	0	0	0	0
Chrysomelidae 2	0	0,021	0	0,087	0	0	0	0	0	0,009	0,010	0	0	0	0	0	0,007
Chrysomelidae 3	0	0	0	0	0	0	0	0,114	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chrysomelidae 4	0	0	0	0,087	0	0	0	0	0,017	0,001	0,009	0	0	0	0	0	0
Chrysomelidae 5	0	0,025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chrysomelidae 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,020	0	0	0	0	0
Chrysomelidae 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,034
Curculionidae 1	0	0	0	0,478	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DIPTERA																	
Stratiomyidae 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,005	0	0	0	0	0	0	0
Syrphidae 1	0	0	0	0,087	0	0	0	0	0	0	0	0,156	0	0	0,007	0	0,010
Syrphidae 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,012	0	0	0	0	0	0
Syrphidae 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,005	0	0	0	0	0	0
Syrphidae 4	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0,008	0,016	0,042	0	0,004	0,029	0	0,400	0,037
Syrphidae 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,010	0	0
<i>Baccha</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ocyptamus</i> sp. 1	0	0	0,006	0	0,140	0	0,014	0	0,003	0	0,001	0,008	0	0	0,003	0	0,007
<i>Ocyptamus</i> sp. 2	0	0	0	0	0,036	0	0	0	0	0	0	0	0	0,002	0	0,600	0
<i>Ocyptamus</i> sp. 3	0	0	0	0	0,014	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ocyptamus</i> sp. 4	0,006	0	0,006	0	0	0	0	0	0	0,006	0,003	0	0	0,011	0,059	0	0
<i>Ocyptamus</i> sp. 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ocyptamus</i> sp. 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,002	0	0	0	0

HEMIPTERA

Miridae 1	0	0,023	0,028	0	0	0	0	0	0	0	0,003	0,008	0	0,007	0,003	0	0,044
-----------	---	-------	-------	---	---	---	---	---	---	---	-------	-------	---	-------	-------	---	-------

HYMENOPTERA

Apidae 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,002	0,023	0,109	0,002	0,018	0,007	0	0,040
Apidae 2	0	0	0	0	0	0	0	0,019	0	0	0	0	0	0	0,010	0	0,007
<i>Apis mellifera</i>	0,337	0,064	0,119	0	0,369	0	0,383	0	0,725	0,029	0,009	0	0,034	0	0	0	0,007
<i>Exomalopsis</i> sp.	0,006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Melipona bicolor</i>	0	0	0	0	0,066	0	0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Melipona quadrifasciata</i>	0	0	0	0	0,149	0	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Melipona mondury</i>	0	0	0	0	0,118	0	0,117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paratrigona</i> sp.	0,034	0,010	0,062	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,034
<i>Plebeia droryana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,050	0,008	0,040	0,055	0	0	0	0	0
<i>Plebeia phrynostoma</i>	0	0,148	0,220	0	0	0	0	0,506	0	0	0	0	0	0,011	0,087	0	0,054
<i>Plebeia</i> sp.	0	0,033	0	0	0	0	0	0,167	0,011	0	0	0	0	0	0,115	0	0
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	0	0,123	0,062	0	0,047	0	0,164	0,157	0,176	0	0	0	0	0	0	0	0,192
<i>Tetragona</i> sp.	0,011	0,363	0,023	0	0	0	0,008	0	0	0,694	0,483	0	0,647	0,353	0,192	0	0
<i>Tetragonisca angustula</i>	0,513	0,187	0,345	0	0,033	0	0,004	0,009	0	0,220	0,319	0,109	0,304	0,524	0,202	0	0,529
<i>Trigona spinipes</i>	0	0	0	0	0,028	0	0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paratetrapedia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,009	0	0	0	0	0	0	0
<i>Colletes</i> sp.	0,013	0	0	0,087	0	0	0	0,028	0	0	0	0	0	0	0,049	0	0
<i>Augochlora</i> sp. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,105	0	0	0	0	0
<i>Augochlora</i> sp. 2	0,022	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0,014	0	0	0	0	0	0
<i>Augochlora</i> sp. 3	0	0	0	0,043	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Augochlorella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,018	0	0	0	0	0	0
<i>Augochloropsis</i> sp.	0	0,004	0,006	0,130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,038	0,003	0	0
<i>Dialictus</i> sp.	0,049	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,006	0	0	0	0
<i>Megachile</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0,301	0	0,011	0,001	0,008	0,367	0	0,007	0,251	0	0

Material suplementar 3: Caracteres analisados nas inflorescências e nas flores (média \pm desvio padrão) de 17 espécies de *Piper* em floresta estacional semidecídua, Viçosa, Brasil.

Espécies	Arranjo	Comprimento da inflorescência (mm)	Pedicelo (mm)	Estilete (mm)	Área estigmática (mm ²)	Quantidade de pólen/antera
<i>Piper aduncum</i>	1	100,5 \pm 9,1	0	0	0,035 \pm 0,070	2.135 \pm 320,6
<i>P. amplum</i>	1	64,0 \pm 5,1	0	0	0,032 \pm 0,013	4.405 \pm 1.508,6
<i>P. anisum</i>	1	81,1 \pm 14,5	0,877 \pm 0,21	0	0,017 \pm 0,008	19.845 \pm 5.703,2
<i>P. arboreum</i>	1	76,7 \pm 10,4	0	0	0,062 \pm 0,015	5.590 \pm 2.625,1
<i>P. caldense</i>	1	37,8 \pm 6,2	0	0,246 \pm 0,06	0,085 \pm 0,021	12.395 \pm 4.181,7
<i>P. cernuum</i>	1	539,7 \pm 86,8	0	0	0,201 \pm 0,084	6.555 \pm 1.816,0
<i>P. chimonanthifolium</i>	1	75,2 \pm 11,0	0	0	0,038 \pm 0,011	6.005 \pm 1.438,1
<i>P. corcovadensis</i>	1	74,2 \pm 10,4	0,959 \pm 0,43	0	0,036 \pm 0,016	16.995 \pm 6.289,3
<i>P. crassinervium</i>	1	79,5 \pm 6,2	0	0,319 \pm 0,07	0,046 \pm 0,013	3.665 \pm 1.428,9
<i>P. gaudichaudianum</i>	1	92,4 \pm 12,0	0	0	0,014 \pm 0,005	10.015 \pm 4.056,1
<i>P. hispidum</i>	1	84,4 \pm 8,4	0	0	0,025 \pm 0,015	5.735 \pm 2.160,9
<i>P. lucaeum</i>	1	73,8 \pm 9,1	0	0	0,012 \pm 0,002	6.955 \pm 482,2
<i>P. malacophyllum</i>	1	111,2 \pm 12,1	0	0	0,023 \pm 0,012	5.880 \pm 1.228,6
<i>P. mollicomum</i>	1	88,8 \pm 16,5	0	0	0,027 \pm 0,009	5.490 \pm 1.663,8
<i>P. pubisubmarginalum</i>	1	60,0 \pm 7,7	0	0	0,026 \pm 0,012	4.285 \pm 2.635,9
<i>P. umbellatum</i>	4 \pm 1,2	76,8 \pm 5,7	0	0	0,015 \pm 0,007	1.605 \pm 598,4
<i>P. vicosanum</i>	1	31,4 \pm 3,4	0	0	0,028 \pm 0,012	2.100 \pm 707,5

Material suplementar 4: Caracteres morfológicos analisados nos visitantes florais (média \pm desvio padrão) observados em 17 espécies de *Piper* em floresta estacional semidecídua, Viçosa, Brasil.

Espécies	N	Comprimento do corpo (mm)	Área do abdômen (mm ²)	Área do tórax (mm ²)	Comprimento das pernas (mm)		
					posterior	mediana	anterior
COLEOPTERA							
Chrysomelidae 1	7	3,151 \pm 0,27	0,763 \pm 0,16	1,091 \pm 0,16	2,740 \pm 0,39	2,141 \pm 0,25	1,618 \pm 0,48
Chrysomelidae 2	3	2,824 \pm 0,15	0,616 \pm 0,007	0,743 \pm 0,18	2,448 \pm 0,22	1,934 \pm 0,25	1,650 \pm 0,23
Chrysomelidae 3	1	2,577	0,849	0,919	2,349	1,523	1,267
Chrysomelidae 4	3	3,259 \pm 0,27	0,446 \pm 0,24	0,784 \pm 0,08	2,630 \pm 0,21	2,152 \pm 0,35	1,781 \pm 0,13
Chrysomelidae 5	1	3,168	0,256	0,878	2,384	2,294	1,744
Chrysomelidae 6	1	2,968	0,633	0,774	2,668	1,955	1,906
Chrysomelidae 7	1	2,840	0,672	0,908	2,449	2,169	1,569
Curculionidae 1	2	2,838 \pm 0,26	2,415 \pm 0,22	0,497 \pm 0,11	2,051 \pm 0,11	1,910 \pm 0,001	1,796 \pm 0,02
DIPTERA							
Stratiomyidae 1	1	5,609	3,307	1,909	4,29	2,963	2,652
Syrphidae 1	1	5,643	1,917	0,952	3,493	2,048	1,969
Syrphidae 2	1	14,359	15,347	11,217	10,872	7,522	4,889
Syrphidae 3	1	12,92	8,652	4,288	8,607	5,976	4,249
Syrphidae 4	2	14,085 \pm 0,16	9,096 \pm 1,18	5,671 \pm 0,07	8,377 \pm 0,84	6,650 \pm 0,48	4,991 \pm 0,35
Syrphidae 5	1	10,866	12,851	7,275	6,869	5,381	4,236
<i>Baccha</i> sp.	2	8,951 \pm 0,94	1,836 \pm 0,54	1,764 \pm 0,14	4,399 \pm 0,63	3,781 \pm 0,43	3,371 \pm 0,34
<i>Ocyptamus</i> sp. 1	3	5,763 \pm 0,45	2,755 \pm 1,13	1,304 \pm 0,32	3,404 \pm 0,40	2,797 \pm 0,38	1,997 \pm 0,30
<i>Ocyptamus</i> sp. 2	1	9,826	2,805	1,918	4,702	3,155	2,583
<i>Ocyptamus</i> sp. 3	1	4,811	0,968	0,786	3,457	2,560	1,605
<i>Ocyptamus</i> sp. 4	6	8,048 \pm 0,53	4,915 \pm 1,21	2,373 \pm 0,81	5,613 \pm 0,72	3,977 \pm 0,50	3,131 \pm 0,40
<i>Ocyptamus</i> sp. 5	1	5,39	1,484	0,939	3,292	2,602	2,23
<i>Ocyptamus</i> sp. 6	1	4,712	0,869	0,687	3,358	2,461	1,504
HEMIPTERA							

Miridae 1	5	3,428 ± 0,43	1,748 ± 0,97	0,930 ± 0,24	3,125 ± 0,30	2,598 ± 0,41	2,241 ± 0,33
HYMENOPTERA							
Apidae 1	4	7,830 ± 0,28	5,646 ± 0,20	3,461 ± 0,33	4,861 ± 0,30	3,648 ± 0,16	3,089 ± 0,27
Apidae 2	2	6,019 ± 1,14	4,927 ± 2,84	2,559 ± 1,04	4,202 ± 0,07	3,328 ± 0,14	2,829 ± 0,52
<i>Apis mellifera</i>	7	11,445 ± 0,30	18,675 ± 2,29	9,583 ± 1,04	8,377 ± 0,61	6,365 ± 0,51	4,893 ± 0,51
<i>Exomalopsis</i> sp	1	7,047	8,466	4,969	5,964	5,324	4,064
<i>Melipona bicolor</i>	1	9,064	7,941	9,723	8,413	6,982	4,29
<i>Melipona quadrifasciata</i>	6	10,385 ± 0,56	15,172 ± 1,48	11,180 ± 1,63	8,191 ± 0,95	7,357 ± 0,64	5,551 ± 0,43
<i>Melipona mondury</i>	6	9,623 ± 0,30	12,872 ± 1,36	9,892 ± 1,29	8,838 ± 0,89	7,625 ± 1,40	5,225 ± 0,62
<i>Paratrigona</i> sp.	2	4,372 ± 0,26	2,103 ± 0,11	2,124 ± 0,63	4,230 ± 0,30	3,951 ± 0,42	2,769 ± 0,80
<i>Plebeia droryana</i>	3	3,904 ± 0,17	1,891 ± 0,23	1,696 ± 0,04	3,293 ± 0,30	2,603 ± 0,20	2,039 ± 0,22
<i>Plebeia phrynostoma</i>	6	3,708 ± 0,30	1,447 ± 0,18	1,462 ± 0,14	3,198 ± 0,24	2,523 ± 0,19	1,985 ± 0,37
<i>Plebeia</i> sp.	9	4,610 ± 0,07	2,518 ± 0,45	2,386 ± 0,22	4,765 ± 0,43	3,672 ± 0,47	2,767 ± 0,24
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	9	7,210 ± 0,35	5,918 ± 0,89	4,285 ± 0,34	6,494 ± 0,57	5,001 ± 0,49	3,824 ± 0,33
<i>Tetragona</i> sp.	10	6,798 ± 0,40	4,255 ± 0,72	3,329 ± 0,26	6,268 ± 0,63	4,927 ± 0,23	3,669 ± 0,36
<i>Tetragonisca angustula</i>	10	4,358 ± 0,27	1,491 ± 0,16	1,440 ± 0,10	3,837 ± 0,33	2,877 ± 0,27	2,292 ± 0,18
<i>Trigona spinipes</i>	1	6,110	3,510	3,754	5,460	4,555	3,731
<i>Paratetrapedia</i> sp.	1	10,443	11,412	8,194	8,06	5,417	4,27
<i>Colletes</i> sp.	4	8,996 ± 0,14	8,933 ± 0,80	5,197 ± 0,33	5,160 ± 0,75	4,193 ± 0,28	3,874 ± 0,19
<i>Augochlora</i> sp. 1	2	8,077 ± 0,31	5,838 ± 0,05	3,358 ± 0,007	4,877 ± 0,49	3,948 ± 0,76	3,290 ± 0,09
<i>Augochlora</i> sp. 2	2	8,230 ± 0,53	5,718 ± 0,02	4,056 ± 0,32	5,625 ± 0,03	3,737 ± 0,28	3,113 ± 0,21
<i>Augochlora</i> sp. 3	1	6,552	4,176	2,546	3,965	2,858	2,500
<i>Augochlorella</i> sp.	1	6,665	3,967	2,962	4,137	3,113	2,864
<i>Augochloropsis</i> sp.	2	7,796 ± 0,37	6,726 ± 0,80	3,994 ± 0,30	5,509 ± 0,69	3,716 ± 0,25	2,560 ± 0,69
<i>Dialictus</i> sp.	2	3,968 ± 0,03	2,273 ± 0,70	1,046 ± 0,12	3,087 ± 0,56	2,185 ± 0,30	1,927 ± 0,22
<i>Megachile</i> sp.	8	8,246 ± 0,42	8,655 ± 0,47	5,807 ± 0,63	6,143 ± 0,43	4,928 ± 0,71	4,577 ± 0,39

CAPÍTULO 3

Espécies neotropicais de *Piper*: são todas hermafroditas?

RESUMO

A expressão sexual tem sido usada como caráter distintivo entre os clados do gênero *Piper*. Flores unissexuais são descritas para as espécies paleotropicais, que geralmente são dioicas, enquanto flores bissexuais são associadas às espécies neotropicais, consideradas hermafroditas. Entretanto, o registro de uma espécie andromonoica no Neotrópico, associado à similaridade morfológica das flores de *Piper*, sugere que a presença de flores funcionalmente unissexuais pode ser mais comum do que o registrado até o momento. Para investigar essa possibilidade, determinamos a expressão sexual de 17 espécies neotropicais de *Piper*, enfocando a funcionalidade das flores ao longo da antese em indivíduos de uma floresta estacional semidecídua. Encontramos 13 espécies hermafroditas, uma andromonoica e três com combinações variáveis de indivíduos hermafroditas, andromonoicos e masculinos. As flores estaminadas apresentaram unissexualidade criptica. As espécies com mais de um tipo floral apresentaram dimorfismo sexual quanto ao comprimento de suas inflorescências e dos pistilos das flores. Apesar de o hermafroditismo ser a expressão sexual predominante entre as espécies neotropicais de *Piper*, observamos variações dessa expressão em quase 25% das espécies aqui estudadas, o que indica que as flores unissexuais podem ter surgido de forma independente em diferentes clados das espécies neotropicais e paleotropicais.

PALAVRAS-CHAVE ADICIONAIS: andromonoicia – dimorfismo sexual – funcionalidade floral – unissexualidade criptica.

* Manuscrito submetido para a revista “*Botanical Journal of the Linnean Society*”.

INTRODUÇÃO

A maioria das espécies de angiospermas é hermafrodita (Yampolsky & Yampolsky, 1922; Barrett & Hough, 2013), mas existem outros tipos de expressões sexuais devido à presença de diferentes tipos florais em um ou mais indivíduos de uma espécie (Sakai & Weller, 1999). A morfologia floral auxilia na determinação da expressão sexual, entretanto também é necessário analisar a funcionalidade das flores pois flores morfologicamente hermafroditas podem apresentar androceu ou gineceu não funcionais (Mayer & Charlesworth, 1991). Dessa forma, expressões sexuais pouco comuns podem ser detectadas como a dioica criptica (Mayer & Charlesworth, 1991) e a androdioica funcional (p. ex., Liston, Rieseberg & Elias, 1990; Zhou, Ma & Liu, 2016).

Piper L. possui cerca de 2.000 espécies com distribuição pantropical (Quijano-Abril, Callejas-Posada & Miranda-Esquível, 2006) e se originou no Neotrópico (Smith *et al.*, 2008), região onde ocorre a maior diversidade de espécies (Jaramillo & Manos, 2001). No Brasil, está representado por 290 espécies (Guimarães *et al.*, 2015) e a Floresta Tropical Atlântica é um dos centros de diversificação e de endemismos do gênero, com cerca de 150 espécies (Jaramillo & Manos, 2001; Quijano-Abril *et al.*, 2006).

As diminutas flores das espécies de *Piper* são morfologicamente similares: aperiantadas, protegidas por uma bráctea, com 1-10 estames e 3-4 carpelos (Yuncker, 1972; 1973; Jaramillo & Manos, 2001). Estudos filogenéticos mostraram que o gênero é composto por três clados que diferem quanto à distribuição geográfica e à expressão sexual das espécies (Jaramillo & Manos, 2001; Jaramillo *et al.*, 2008). Flores bissexuais e, portanto, espécies hermafroditas têm sido descritas para o Neotrópico, enquanto no Paleotrópico (Ásia e Pacífico Sul) predominam flores unissexuais e espécies dioicas (Wanke *et al.*, 2007; Jaramillo *et al.*, 2008). Apesar dessa diferença, não é claro se a expressão sexual é uma sinapomorfia desses clados (Jaramillo & Manos, 2001).

Apesar de o hermafroditismo ser considerado a única expressão sexual das espécies neotropicais, Figueiredo & Sazima (2000) mostraram que pode existir variação, como a andromonoiccia observada em *Piper arboreum* Aubl. Essa espécie apresentou flores bissexuais e flores funcionalmente estaminadas na mesma planta, entretanto a ocorrência de dimorfismo sexual, característica comum em espécies com mais de um tipo floral (Eckhart, 1999), não foi descrita para essa espécie.

A avaliação de caracteres florais em espécimes de *Piper* em herbário é difícil (Jaramillo & Manos, 2001), pois pode mascarar pequenas variações morfológicas nas flores e apresenta limitações em relação à sequência temporal de eventos da antese. Consequentemente, a presença de flores funcionalmente unissexuais pode ser mais comum do

que o registrado até o momento. Dessa forma, objetivamos analisar a expressão sexual em espécies neotropicais de *Piper*, enfocando a sexualidade das flores e das plantas, para verificar a ocorrência de expressões sexuais distintas do hermafroditismo. Além disso, verificamos se há dimorfismo sexual entre inflorescências compostas por tipos florais diferentes.

MATERIAL E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO E ESPÉCIES ESTUDADAS

Realizamos o estudo de abril de 2014 a março de 2016 na ‘Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso’ (daqui em diante, Mata do Paraíso), situada em Viçosa (20°47'-48'S, 42°50'-52'W), estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Esse local possui 194 ha de floresta estacional semidecídua montana (Veloso, Rangel Filho & Lima, 1991) e altitudes variando entre 690 e 870 m.

No local de estudo, registramos 17 espécies de *Piper*, que pertencem a diferentes cladogramas do gênero (Tabela 1). Para amostrar as plantas, percorremos cinco transecções já existentes na área (cerca de 5 km de extensão) e a vegetação adjacente, marcando todas as plantas de *Piper* em estágio reprodutivo. Utilizamos como critério de inclusão a presença de estruturas reprodutivas (inflorescências com botões florais, flores ou frutos) ou de cicatrizes de episódios reprodutivos anteriores (Valentin-Silva & Vieira, 2015). Depositamos material testemunho no acervo do Herbário BOTU do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Botucatu (Tabela 1).

EXPRESSÃO SEXUAL

Avaliamos a morfologia floral de todas as espécies, para verificar a existência de variações no androceu e no gineceu que indicassem a presença de flores funcionalmente unissexuais. Para tanto, coletamos inflorescências, que analisamos frescas ou fixadas (estocadas em etanol 70%) com auxílio de lupa de mão (aumento de 60X) ou sob estereomicroscópio, em indivíduos de todas as espécies (Tabela 1). Adicionalmente, verificamos a funcionalidade das flores ao longo da antese. Sorteamos três plantas/espécie dentre as inicialmente marcadas e acompanhamos, em todas as inflorescências, os eventos ocorridos durante a antese das flores até sua senescência para definir o sexo das flores. Em seguida, avaliamos a distribuição dos tipos florais observados nos indivíduos de cada espécie para definir o sexo das plantas.

Nas espécies em que identificamos em campo a presença de mais de um tipo floral, analisamos exsiccatas para verificar a presença desses tipos florais em outras populações. Dessa forma, poderemos avaliar se a presença de mais de um tipo floral é característica

Tabela 1. Número de indivíduos de *Piper* analisados, tipo de inflorescência, número de estames e estigmas por tipo floral e número do material testemunho coletado em floresta estacional semidecídua, Viçosa, sudeste do Brasil.

Espécie	Clado	Indivíduos	Inflorescência	Flores bissexuais		Flores unissexuais	N° voucher (BOTU)
				Estames	Estigmas	Estames	
<i>Piper aduncum</i> L.	Radula	13	espiga	4	3		32.180, 32.198
<i>P. amplum</i> Kunth	Radula	11	espiga	6	3		32.187, 32.194
<i>P. anisum</i> (Spreng.) Angely	Ottonia	12	racemo	4	4		32.188
<i>P. arboreum</i> Aubl.	Macrostachys	10	espiga	4	3-4	4	32.181
<i>P. caldense</i> C. DC.	Peltobryon	15	espiga	4	3	4	32.195, 32.201
<i>P. cernuum</i> Vell.	Macrostachys	14	espiga	4	3-4	4	32.172, 32.200
<i>P. chimonanthifolium</i> Kunth	Radula	15	espiga	4	3	4	32.196, 32.199
<i>P. corcovadensis</i> (Miq.) C. DC.	Ottonia	15	racemo	4	4		32.191
<i>P. crassinervium</i> Kunth	Radula	11	espiga	4	3		32.175, 32.177
<i>P. gaudichaudianum</i> Kunth	Radula	12	espiga	4	3		32.173, 32.183
<i>P. hispidum</i> Sw.	Radula	15	espiga	4	3		32.174, 32.184
<i>P. lucaeanum</i> Kunth	Schilleria	15	espiga	3	3		32.182, 32.193
<i>P. malacophyllum</i> (C. Presl) C. DC.	Radula	10	espiga	4	3		32.178, 32.185
<i>P. mollicomum</i> Kunth	Radula	10	espiga	4	3		32.179, 32.190
<i>P. pubisubmarginalum</i> Yunck.	Schilleria	15	espiga	3	3		32.192
<i>P. umbellatum</i> L.	Pothomorphe	15	espigas em umbela	2	3		32.176
<i>P. vicosanum</i> Yunck.	Radula	15	espiga	4	3		32.189, 32.197

apenas da população estudada em Viçosa ou se é uma característica da espécie. A presença de flores estaminadas nas exsicatas foi confirmada quando observamos inflorescências com flores em antese, que estavam liberando pólen, mas cujo gineceu apresentava-se atrofiado, com os estigmas abaixo das anteras (todas as flores bissexuais das espécies estudadas apresentaram protoginia incompleta; veja capítulo 4).

Nas espécies com mais de um tipo floral, analisamos o comprimento das inflorescências compostas por cada um dos tipos florais, o comprimento do pistilo, o número de grãos de pólen produzido por antera e a viabilidade polínica em cada tipo floral para verificar se existia dimorfismo sexual. Medimos o comprimento das inflorescências com paquímetro digital ou fita métrica em 10 inflorescências ($n = 10$ plantas/tipo floral/espécie). Para medir o comprimento do pistilo, fizemos fotografias em estereomicroscópio com câmera digital acoplada. Processamos as imagens no programa LAS v. 3.8, no qual fizemos as medidas em 10 flores ($n = 10$ plantas/tipo floral/espécie).

Contamos o número de grãos de pólen por antera, por meio de técnica adaptada de Roulston (2005). Em um tubo, colocamos uma antera indeiscente, maceramos em 0,5 mL de água destilada e homogeneizamos a amostra em agitador por 30 segundos. Retiramos uma alíquota de 0,01 mL e realizamos a contagem do número de grãos de pólen em lâmina quadriculada, ao microscópio de luz. Extrapolamos o valor encontrado na alíquota para a amostra inicial. Contamos o número de grãos de pólen em 10 anteras ($n = 10$ plantas/tipo floral/espécie).

Testamos a viabilidade polínica com carmim acético (Radford *et al.*, 1974), em 10 inflorescências ($n = 10$ plantas/tipo floral/espécie). Para tanto, maceramos cinco anteras de diferentes flores de uma mesma inflorescência sob uma gota de carmim acético. Em cada lâmina, contamos 200 grãos de pólen em microscópio de luz, separando-os em viáveis e não viáveis com base na coloração, formato e tamanho dos mesmos (Kearns & Inouye, 1993).

Comparamos o comprimento das inflorescências, o comprimento do pistilo, o número de grãos de pólen por antera e a viabilidade polínica nas espécies com mais de um tipo floral por meio de teste de comparação de médias (ANOVA para comprimento das inflorescências em *P. chimonanthifolium* e teste t para as demais espécies e variáveis), utilizando o programa computacional R (R Core Team, 2016). Os dados de viabilidade polínica foram transformados (arco-seno) para atender ao requisito de normalidade.

RESULTADOS

Das 17 espécies estudadas, 13 possuíam apenas flores bissexuais (Tabela 1, Fig. 1A), caracterizando a expressão sexual dessas espécies como hermafrodita. As outras quatro

espécies apresentaram dois tipos florais, flores bissexuais e funcionalmente unissexuais masculinas (daqui em diante, estaminadas) (Tabela 1). As flores estaminadas apresentaram gineceu composto por um pistilo reduzido e não funcional (pistilódio; Fig. 1B) e senesceram após a liberação de pólen. Confirmamos a presença de flores estaminadas em *P. arboreum*, *P. caldense*, *P. cernuum* e *P. chimonanthifolium* em exsicatas de espécimes coletados em diferentes regiões do Brasil (Tabela 2, Informação suporte).

Piper cernuum apresentou dois tipos florais (Tabela 1) que ocorreram em um mesmo indivíduo. Cada inflorescência apresentou apenas um tipo floral, ou seja, havia espigas com flores bissexuais e espigas com flores estaminadas (cinco plantas analisadas), caracterizando sua expressão sexual como andromonoica.

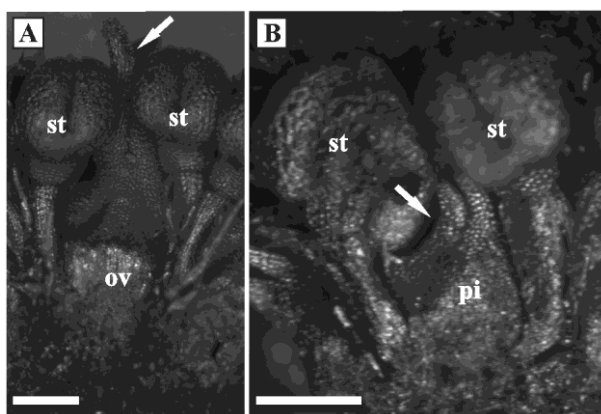


Figura 1. Tipos florais observados em espécies de *Piper* em floresta estacional semidecídua, em Viçosa, sudeste do Brasil. A, flor bissexual (observe os estigmas entre as anteras, seta). B, flor funcionalmente masculina (observe os estigmas atrofiados, seta) em *P. chimonanthifolium*. ov = ovário, pi = pistilódio, st = estame. Barras: 200 μ m.

Tabela 2. Número de exsicatas de espécies de *Piper* analisadas para verificar a presença de flores estaminadas.

Espécie	Exsicatas		
	Total	Com flores bissexuais	Com flores estaminadas
<i>Piper arboreum</i>	871	186	58
<i>P. caldense</i>	274	87	23
<i>P. cernuum</i>	257	25	6
<i>P. chimonanthifolium</i>	79	25	7

Piper arboreum e *P. caldense* também apresentaram esses dois tipos florais (Tabela 1), entretanto a distribuição variou nos indivíduos. Em *P. arboreum*, observamos dois indivíduos apenas com espigas com flores bissexuais e três indivíduos com os dois tipos

florais (espigas com flores bissexuais e espigas com flores estaminadas). Logo, houve indivíduos hermafroditas e indivíduos andromonoicos. *Piper caldense* também apresentou dois tipos de indivíduos: 13 com espigas com flores bissexuais e espigas com flores estaminadas e dois apenas com espigas com flores estaminadas. Portanto, houve indivíduos andromonoicos e indivíduos masculinos na população analisada.

Piper chimonanthifolium, além de ter os dois tipos florais (Tabela 1), apresentou variação na distribuição desses tipos nas inflorescências e nas plantas. Observamos três tipos de inflorescências: espigas com flores bissexuais, espigas com flores estaminadas e espigas com os dois tipos florais (espigas mistas). As espigas mistas apresentaram flores bissexuais na porção basal e flores estaminadas na porção apical; a proporção dos tipos florais variou entre inflorescências, mas geralmente predominou flores bissexuais. As flores bissexuais das espigas mistas frutificaram, enquanto as flores estaminadas senesceram após a liberação de pólen e a porção da espiga com essas flores normalmente era eliminada. Dos 15 indivíduos analisados, cinco apresentaram apenas espigas com flores bissexuais, dois tinham espigas com flores bissexuais e espigas com flores estaminadas, dois tinham espigas com flores bissexuais e espigas mistas e seis tinham os três tipos de espigas. Portanto, houve indivíduos hermafroditas e indivíduos andromonoicos.

Essas espécies apresentaram diferença entre os tipos florais apenas no comprimento das inflorescências e do pistilo (Tabela 3). Nas quatro espécies, as espigas com flores bissexuais foram mais longas do que as espigas com flores estaminadas. No caso de *Piper chimonanthifolium*, as espigas mistas apresentaram comprimento intermediário entre as espigas com flores bissexuais e as com flores estaminadas (Tabela 3). O pistilo das flores bissexuais foi mais comprido do que nas flores estaminadas nas quatro espécies (Tabela 3).

Tabela 3. Características analisadas nas espécies de *Piper* que apresentaram mais de um tipo floral (média \pm desvio padrão) em floresta estacional semidecídua, Viçosa, sudeste do Brasil. H = inflorescência com flores bissexuais, Ma = inflorescência com flores estaminadas, Mi = inflorescência mista (com flores bissexuais e estaminadas), B = flor bissexual, E = flor estaminada.

Espécie	Comprimento da inflorescência (cm)			Comprimento do pistilo (mm)		Quantidade de pólen/antera		Viabilidade polínica (%)	
	H	Ma	Mi	B	E	B	E	B	E
<i>Piper arboreum</i>	76,7 \pm 10,9a	50,6 \pm 5,5b	-	0,64 \pm 0,09a	0,46 \pm 0,07b	5.590 \pm 2.625,1a	6.350 \pm 2.987,4a	78,2 \pm 13,6a	70,3 \pm 16,5a
<i>P. caldense</i>	37,8 \pm 6,5a	27,8 \pm 4,6b	-	1,17 \pm 0,13a	0,43 \pm 0,09b	12.395 \pm 4.181,7a	12.675 \pm 2.185,3a	97,2 \pm 1,3a	97,3 \pm 1,9a
<i>P. cernuum</i>	640,0 \pm 84,6a	390,0 \pm 52,4b	-	1,48 \pm 0,12a	0,79 \pm 0,16b	6.555 \pm 1.816,0a	6.980 \pm 2.085,0a	82,9 \pm 10,8a	79,4 \pm 5,1a
<i>P. chimonanthifolium</i>	75,2 \pm 11,6a	42,7 \pm 5,3b	59,9 \pm 5,3c	0,84 \pm 0,08a	0,54 \pm 0,09b	6.005 \pm 1.438,1a	7.240 \pm 1.184,1a	91,5 \pm 5,2a	92,6 \pm 6,3a

*Médias seguidas por mesma letra em cada linha não diferiram estatisticamente pelo teste t ou pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Flores bissexuais, presentes em todas as 17 espécies estudadas, são consideradas como caráter ancestral em Piperaceae (Tebbs, 1993). Por outro lado, as flores estaminadas observadas em *P. arboreum* (Figueiredo & Sazima, 2000), *P. caldense*, *P. cernuum* e *P. chimonanthifolium* são raras entre as espécies neotropicais; espécies de *Piper* com flores unissexuais são referidas apenas para a Ásia e Pacífico Sul (Jaramillo *et al.*, 2008). As flores estaminadas das espécies neotropicais apresentam unissexualidade criptica *sensu* Mayer & Charlesworth (1991), pois são morfológicamente bissexuais com função unissexual, fato que deve ter contribuído para a interpretação do hermafroditismo como característica universal das espécies neotropicais. As inflorescências da maioria das espécies são compostas apenas por flores bissexuais ou estaminadas. Entretanto, *Piper chimonanthifolium* apresentou composição distinta: além de inflorescências com flores bissexuais e inflorescências com flores estaminadas, possui inflorescências mistas, com os dois tipos florais, característica que não havia sido descrita para as espécies neotropicais do gênero. Resultado semelhante foi observado em *Piper pedicellatum* C. DC., espécie paleotropical e dioica, que apresentou algumas inflorescências mistas compostas por flores bissexuais e flores pistiladas, além de inflorescências femininas (Lei & Liang, 1998). Esses resultados reforçam a necessidade de aliar a análise da morfologia com a da funcionalidade das flores ao longo da antese.

O hermafroditismo, expressão sexual observada na maioria das espécies analisadas, é considerado um dos caracteres que define o clado das espécies neotropicais de *Piper* (Jaramillo *et al.*, 2008). Também foi observada a andromonoiccia em *P. cernuum*, outra expressão sexual monomórfica, além de expressões sexuais dimórficas nas espécies *P. arboreum*, *P. caldense* e *P. chimonanthifolium*. Esses resultados diferiram do exposto por Jaramillo & Manos (2001), que apontaram a expressão sexual como caráter distintivo entre as espécies paleotropicais (dioicas ou monoicas) e as neotropicais (hermafroditas).

A presença de dois tipos de indivíduos com diferentes tipos florais (andromonoicos e hermafroditas em *P. arboreum* e *P. chimonanthifolium* e andromonoicos e masculinos em *P. caldense*) caracterizou as populações dessas espécies como dimórficas *sensu* Sakai & Weller (1999). *Piper arboreum* foi classificada como andromonoica por Figueiredo & Sazima (2000), mas a população estudada por esses autores apresentou expressão sexual semelhante à observada no presente estudo (indivíduos andromonoicos e hermafroditas; Figueiredo, 1997), variando apenas a proporção dos tipos de indivíduos na população. A expressão sexual é variável ao longo do tempo ou espaço (Sakai & Weller, 1999), o que pode explicar as diferenças observadas entre as populações dessa espécie. É possível que as populações analisadas de *P. arboreum* e *P. chimonanthifolium* estejam em transição do hermafroditismo

para a andromonoiccia, que pode ser uma expressão sexual estável ou representar um passo intermediário para a ginodioiccia ou dioiccia (Webb, 1999).

Piper caldense pode ser considerada como androdioica *sensu* Sakai & Weller (1999), pois possui indivíduos com flores estaminadas e outros indivíduos com função hermafrodita (indivíduos andromonoicos, ou seja, com flores bissexuais e estaminadas na mesma planta). A androdioiccia é rara nas angiospermas (Yampolsky & Yampolsky, 1922; Pannell, 2002) e o estudo de outras populações poderá confirmar essa possibilidade. Apesar da androdioiccia geralmente evoluir da dioiccia (Charlesworth, 1984; Pannell, 2002), também pode derivar do hermafroditismo se a espécie for autoincompatível (Webb, 1999), como é o caso de *P. caldense* (capítulo 2). Androdioiccia com ancestral hermafrodita foi observada em *Sagittaria lancifolia* (Alismataceae; Muenchow, 1998; Pannell, 2002).

A diferença no comprimento do pistilo e também no tamanho das espigas com flores bissexuais e com flores estaminadas evidenciou que essas espécies apresentam dimorfismo sexual, respectivamente, em um caráter sexual primário e secundário (Sakai & Weller, 1999). Dessa forma, o comprimento das inflorescências pode ser um caráter diagnóstico para separar os tipos de indivíduos dentro de uma espécie. Diferenças entre tipos florais quanto ao tamanho de peças florais, número de flores na inflorescência e produção de recurso floral (néctar) já foram registradas em diferentes espécies de angiospermas (veja Eckhart, 1999; Barrett & Hough, 2013). Entretanto, não observamos diferença quanto à quantidade e viabilidade dos grãos de pólen, único recurso floral disponível aos polinizadores de *Piper* (Figueiredo & Sazima, 2000; capítulo 2). Por outro lado, a presença de pólen viável nas flores estaminadas e em quantidade semelhante à das flores bissexuais confirmam a sua função masculina.

Apesar de o hermafroditismo ser a expressão sexual predominante entre as espécies neotropicais de *Piper*, variações dessa expressão podem ser mais comuns do que se acreditava inicialmente, considerando que as observamos em quase 25% das espécies aqui estudadas. A presença de flores estaminadas amplia a exportação de pólen nessas plantas e pode estar relacionada com a atração de polinizadores (Primack & Lloyd, 1980; O'Brien, 1994), o que sugere uma possível vantagem na reprodução sexual dessas espécies. Além disso, as outras expressões sexuais encontradas devem ser caráter derivado, já que o gênero *Piper* se originou no Neotrópico (Smith *et al.*, 2008) e a maioria das espécies dessa região é hermafrodita (Jaramillo & Manos, 2001; Jaramillo *et al.*, 2008). Essas variações indicam que a sexualidade das flores deve ser um caráter homoplástico e as flores unissexuais podem ter surgido de forma independente em diferentes clados das espécies neotropicais e paleotropicais.

REFERÊNCIAS

- Barrett SCH, Hough J. 2013.** Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany* **64**: 67-82.
- Charlesworth D. 1984.** Androdioecy and the evolution of dioecy. *Biological Journal of the Linnean Society* **23**: 333-348.
- Eckhart VM. 1999.** Sexual dimorphism in flowers and inflorescences. In: Geber MA, Dawson TE, Delph LF, eds. *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Berlin: Springer-Verlag, 123-148.
- Figueiredo RA. 1997.** Fenologia e ecologia da polinização de espécies de Piperaceae em mata semidecídua do sudeste brasileiro. Tese, Universidade Estadual de Campinas.
- Figueiredo RA, Sazima M. 2000.** Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany* **85**: 455-460.
- Guimarães EF, Carvalho-Silva M, Monteiro D, Medeiros ES, Queiroz GA. 2015.** *Piperaceae*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB190>. Acesso em: 20 nov 2015.
- Jaramillo MA, Manos PS. 2001.** Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* **88**: 706-716.
- Jaramillo M, Callejas R, Davidson C, Smith JF, Stevens AC, Tepe E. 2008.** A phylogeny of the tropical Genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron *psbJ-petA*. *Systematic Botany* **33**: 647-660.
- Kearns CA, Inouye DW. 1993.** *Techniques for pollination biologists*. Niwot: University Press of Colorado.
- Lei LG, Liang HX. 1998.** Floral development of dioecious species and trends of floral evolution in *Piper sensu lato*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **127**: 225-237.
- Liston A, Rieseberg LH, Elias TS. 1990.** Functional androdioecy in the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* **343**: 641-642.
- Mayer SS, Charlesworth D. 1991.** Cryptic dioecy in flowering plants. *Trends in Ecology and Evolution* **6**: 320-325.
- Muenchow GE. 1998.** Subandrodioecy and male fitness in *Sagittaria lancifolia* subsp. *lancifolia* (Alismataceae). *American Journal of Botany* **85**: 513-520.
- O'Brien SP. 1994.** Andromonoecy and fruit set in *Leptospermum myrsinoides* and *L. continentale* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **42**: 751-762.
- Pannell JR. 2002.** The evolution and maintenance of androdioecy. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **33**: 397-425.

- Primack RB, Lloyd DG. 1980.** Andromonoecy in the New Zealand montane shrub manuka, *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae). *American Journal of Botany* **67**: 361-368.
- Quijano-Abril MA, Callejas-Posada R, Miranda-Esquivel DR. 2006.** Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography* **33**: 1266-1278.
- R Core Team. 2016.** *R: A language and environment for statistical computing*. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.) Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 10 ago 2016.
- Radford AE, Dickison WC, Massey JR, Bell CR.1974.** *Vascular plant systematics*. New York: Harper and Row.
- Roulston T. 2005.** Pollen as a reward. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC, eds. *Practical pollination biology*. Cambridge: Enviroquest, 236-241.
- Sakai AK, 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, Delph LF, eds. *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Berlin: Springer-Verlag, 1-31.
- Smith JF, Stevens AC, Tepe EJ, Davidson C. 2008.** Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeography and molecular dating analysis *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). *Plant Systematics and Evolution* **275**: 9-30.
- Tebbs MC. 1993.** Piperaceae. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V, eds. *The families and genera of vascular plants*. Berlin: Springer-Verlag, 516-520.
- Valentin-Silva A, Vieira MF. 2015.** Phenology of two co-occurring *Piper* (Piperaceae) species in Brazil. *Australian Journal of Botany* **63**: 581-589.
- Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA. 1991.** *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: IBGE.
- Wanke S, Jaramillo MA, Borsch T, Samain MS, Quandt D, Neinhuis C. 2007.** Evolution of Piperales – *matK* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**: 477-297.
- Webb CJ. 1999.** Empirical studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. In: Geber MA, Dawson TE, Delph LF, eds. *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Berlin: Springer-Verlag, 61-95.
- Yampolsky C, Yampolsky H. 1922.** Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genetica* **3**: 1-62.

- Yuncker TG. 1972.** The Piperaceae of Brazil - I *Piper* group I, II, III, IV. *Hoehnea* **2**: 19-366.
- Yuncker TG. 1973.**The Piperaceae of Brazil II: *Piper*: Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorrhachis*. *Hoehnea* **3**: 29-284.
- Zhou XJ, Ma L, Liu WZ. 2016.** Functional androdioecy in the rare endemic tree *Tapiscia sinensis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **180**: 504-514.

INFORMAÇÃO SUPORTE

Lista de material examinado nos herbários BOTU, RB, UB e VIC em que observamos a presença de flores estaminadas.

Piper arboreum Aubl.

BRASIL. BAHIA: Itaberaba, ARIE Serra de Orobó, serra da Gameleira, 21/IX/2005, D. Cardoso 793 (RB). ESPÍRITO SANTO: Alegre, propriedade do senhor Adalto, estrada sentido “ponte do baiano”, 29/XI/2010, V.C. Manhães & D.R. Couto 253 (RB); Ibitirama, propriedade particular (Alcindo Luis Mota Filho) a 5 Km da entrada de Ibitirama, 28/X/2012, T.B. Flores & O.R. Campos 1649 (RB); Linhares, Reserva Natural Vale, estrada Roxinho, próximo ao aceiro Catelã, 08/IV/2006, M.A. Pinho-Ferreira, L. Lorenzo, C.D.N. Rodrigues, R.A.G. Viani, V.C. Souza & V.R. Scalon M625 (RB); idem, rio Bananal, mata ciliar, 25/V/2012, D.A. Folli 6863 (RB); Santa Leopoldina, 17/I/2008, L.A. Pereira, E.F. Guimarães, V.F. Mansano, F.L.R. Filardi & G. Heiden 1553 (RB); Santa Teresa, estrada para Santa Leopoldina, em frente a plantação de eucalipto, 13/IX/2006, R. Marquete, N. Marquete, M.C. Valente & J.C. Silva 3900 (RB). GOIÁS: Caldas Novas, córrego Bálamo, 27/VII/1993, H. Santos, C. Soares, S. Cordovil, T.A.B. Dias, D.A. Neto, J.A. Silva & V.S. Silva 161 (RB); Colinas do Sul, APA Pouso Alegre, estrada após Agropecuária Sarkis, entrada a 4,5 Km após a ponte da divisa Minaçú/Colinas do Sul, 02/IX/2005, M.L. Fonseca, R.C. Mendonça, F.C.A. Oliveira, S.A. Pequeno & G.P. Araújo 5928 (RB); Mossâmedes, riacho na base da serra Dourada, 20/XII/2007, R.C. Forzza, R.F. Monteiro, M.M. Saavedra, R. Moura & M.G. Avelar 4566 (RB); Niquelândia, fazenda Engenho, ca. 11 Km de Niquelândia/Dois Irmãos, 27/VI/1997, F.C.A. Oliveira, T.S. Filgueiras, M.L. Fonseca e A.J.V. Santos 774 (RB); Pirenópolis, beira de estrada ligando Pirenópolis a Cacalzinho, 25/VII/1992, A.F. Carvalho 66 (VIC). MINAS GERAIS: Governador Valadares, em praia de areia na margem do rio Doce, 23/XI/1941, M. Magalhães 784 (RB); Juiz de Fora, Reserva Biológica Poço das Antas, 05/I/1989, O. Moreira & S. Borges 23422 (RB); Ouro Preto, Parque Estadual do Itacolomi, mata do Cibrão, 13/III/2007, R.S. Araújo & T.S. Coser s/n (VIC); Raul Soares, sítio córrego de Ubá, 03/VIII/1992, A.F. Carvalho 36 (RB); idem, 03/VIII/1992, A.F. Carvalho 37 (RB, VIC); Uberlândia, Estação Ecológica do Pangua, 19/VI/1993, Feep 453 (RB); Viçosa, Recanto das Cigarras, 30/IV/1998, S.A.M. Alves 69 (RB, VIC). PARANÁ: Paranaguá, rodovia BR-277, trevo para Alexandra, 28/XI/2014, J.M. Silva & J.T. Motta 8699 (RB). RIO DE JANEIRO: Cachoeiras de Macacu, street between Funchal and Guapiaçu, near REGUA, 02/VI/2009, K. Baker & J. Wesenberg KB186 (RB); Duque de Caxias, III Distrito, Parque Natural Municipal de Taquara, trilha da cachoeira, 14/VI/2008, M.L.C. Valim, C.G. Campos,

F.R. Souza, N. Silva, C.F. Silva, F.P. Uribbe & C.E.S. Jascone 7 (RB); Itatiaia, Parque Nacional de Itatiaia, parte baixa, estrada para o Lago Azul, 28/X/2011, A. Lobão & G.C. Lopes 1719 (RB); Maricá, Itaipuaçu, Parque Estadual da Serra da Tiririca, morro da Serrinha, antigo túnel ferroviário, 28/V/2014, G.A. Queiroz, D.N.S. Machado & L.P.M. Moraes 147 (RB); Magé, 28/V/1983, R.R. Guedes 231 (RB); idem, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, serra da Estrela, trilha entre Piabetá e Petrópolis, 20/I/2010, R.A. Engelmann & O. Thier RE468 (RB); Mangaratiba, ilha de Marambaia, trilha para a praia da Armação, 08/VI/2004, M. Nadruz & M. Souza 1565 (RB); Nova Iguaçu, Reserva Biológica do Tinguá, 22/X/2002, L.C. Giordano, E.F. Guimarães, M.G. Bovini, S.J. Siva Neto & W. Silva 2597 (RB); Paraíba do Sul, estrada de terra que liga BR-393 a Fazenda Roque dos Olhos d'Água e Fazenda Reunidas, 26/VII/2004, M. Carvalho-Silva, R. Marquete, C. Valente & J.C. Silva 268 (RB); Parati, Laranjeiras, caminho para a praia do Sono, após a segunda porteira, fazenda Santa Maria, 04/VII/1992, L.C. Giordano, E.F. Guimarães, J. Caruso e J.C. Silva 1384 (RB); Petrópolis, Carangola, XII/1943, G.C. Goés & D. Constantino 900 (RB); Rio de Janeiro, Copacabana, Área de Proteção Ambiental de Chacrinha, borda de mata na área de lazer do parque, 12/II/2004, L.J.T. Cardoso 102 (RB); idem, Jardim Botânico, mata de encosta do Parque Lage, trilha a direita da terceira queda d'água da cachoeira do Cabo de Aço, 11/IV/1995, L.C. Giordano, R. Furks, P. Botelho, R. Garcia & F. Pinheiro 1893 (RB); idem, maciço da Tijuca, serra da Carioca, morro Mundo Novo, Botafogo, campus da Universidade Santa Úrsula, 14/I/1993, J.M.A. Braga & T. Konno 221 (RB); idem, morro Mundo Novo, propriedade da U.S.U., 18/XII/1985, M. Gomes 21 (RB); idem, Pedra de Itaúna, 29/VII/1971, D. Sucre 7591 (RB); idem, Sumaré, 11/V/1955, E.F. Guimarães 16 (RB); Santa Maria Madalena, Alto do Imbé, estrada para Cruzeiro, terras do senhor Jorge, 24/X/2012, J.F.A. Baumgratz, M. Nadruz, B.C. Bandeira & M. Souza 1251 (RB); idem, Parque Estadual do Desengano, Alto Imbé, picada para o Cruzeiro, 24/X/2012, B.C. Bandeira, J.F.A. Baumgratz, M. Nadruz & M.C. Souza 141 (RB); Silva Jardim, Reserva Biológica Poço das Antas, mata secundária próxima ao plantio de Biovert – modelo tradicional, 15/IX/2001, C. Duarte 115 (RB); Teresópolis, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, fazenda Mandioca, caminho para Poço da Esmeralda, 23/II/1984, L. Mantone & E.F. Guimarães 71 (RB); Vassouras, Avelar, Horto Florestal de Pau Grande, 20/II/1978, M. Santos et al. 2 (RB); Visconde de Mauá, Parque Nacional de Itatiaia, ao lado do abrigo 2, 06/XII/2006, R. Marquete & V.F. Mansano 4027 (RB). SÃO PAULO: Barra do Turvo, estrada de acesso a Barra do Turvo, 08/II/1995, H.F. Leitão-Filho, R.R. Rodrigues, A. Rozza, T. Sposito, K. Santos & A.P. Vieira s/n (RB); Boa Esperança do Sul, margem da mata ciliar do rio Jacaré, 07/VII/1964, J.C. Gomes Jr. 2029 (UB); Caraguatatuba, 17/III/2006, A. Oliveira & C. Purcell 2121 (RB); Colômbia, distrito de

Laranjeiras, fazenda Perdizes, 27/VII/1994, W. Marcondes-Ferreira & L.L. Venturi 947 (RB); Iguapé, Estação Ecológica Juréia-Itatins, serra da Juréia, praia do Uma, 13/IV/1994, E.A. Anunciação & I. Cordeiro 484 (RB); Pedregulho, Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus, em capoeirinha, brejo das nascentes, próximo da casa do núcleo de Santa Luzia, 23/I/1993, J.R. Guillaumon & I.H.D. Castello-Branco 16066 (RB); Pindorama, Estação Ecológica de Pindorama, 09/VI/1994, R. Pilati 443 (RB); São José do Rio Preto, subdistrito de Talhado, sítios Nossa Senhora Aparecida e São Sebastião, 30/V/2009, I.M. Silva 87 (RB); São Vicente, Parque Estadual Xixová-Japuí, praia de Paranapuã, 05/VII/2002, J.A. Pastore & C. Moura 1172 (RB); Teodoro Sampaio, Reserva Morro do Diabo, 27/VII/1985, M.C.W. Vieira 801 (RB); Ubatuba, Horto do IAC, caminho para a trilha do fundo (escravos), 15/V/2007, C.F. Nardim, F.R.G. Amaral, L.C. Bernacci, J.L. Silva, L.L. Haber & M.A.R. Vieira 78 (RB); Vera Cruz, Escola Agrícola Estadual, mata ciliar degradada, 18/VIII/1998, R.B. Torres, J.C. Sales et al. 555 (RB).

Piper caldense C. DC.

BRASIL. BAHIA: Itapebí, Lombardia, 07/XI/1967, R.S. Pinheiro & T.S. Santos 358 (RB). ESPÍRITO SANTO: Aracruz, Barra do Riacho, 15/X/2009, V.B. Sarnaglia Junior 180 (RB); Sooretama, Vale do Rio Doce Forest Reserve, Gávea Rd km 8, 25/XI/2004, M.A. Jaramillo, J.E. Meirelles & M. Nadruz 796 (RB). MINAS GERAIS: Araponga, Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, trilha do Mundo, R. Marquete, E.F. Guimarães, L.C. Giordano, T. Carrijo, L.S. Leoni & M. Avelar 4101 (RB); Barroso, estrada Invejosa-Severiano Resende (antiga linha férrea), 26/VII/2003, L.C.S. Assis & M.S. Guimarães 877 (RB); Nova Lima, mina do Tamanduá, IX/1995, L.V. Costa s/n (RB); Patos de Minas, chácara do sennhor Moacir Quintino, 12/VII/2010, J.E.Q. Faria 887 (UB); Rio Preto, serra do Funil, 20/VIII/2004, C.N. Matozinhos, O.J.B. Neto, B.F. Mello, F.R.G. Salimena & P.H. Nobre 3 (RB); Viçosa, Reserva Florestal Paraíso, 08/VII/1997, S.A.M. Alves 38 (VIC); idem, 20 m antes do final da trilha principal, 15/VIII/1997, S.A.M. Alves 40 (RB). RIO DE JANEIRO: Cantagalo, conglomerado 177-3-1-64-R, 17/XII/2013, L.B. Pimentel, A.S.C. Junqueira, M. Ramos & R. Giovanetti-Alves s/n (RB); Nova Friburgo, Macaé de Cima, fazenda Ouro Verde, 18/VII/1993, C.M. Vieira & L.C. Gurken 314 (RB); idem, sítio Hum Baccus, 13/IX/1990, C.M.B. Correira, L. Maltone, E.F. Guimarães & J. Caruzo 241 (RB); idem, matas de Theodoro de Oliveira, 09/VIII/1989, L.C. Fogaça & A. Amorim 47 (RB); Petrópolis, Araras, Vivenda da Cachoeira, 10/VIII/1980, V.F. Ferreira 1309 (RB); Serra dos Órgãos, parque, 30/VIII/1964, G. Pabst, G. Hatschbach & E. Pereira 9134 (RB); Teresópolis, Granja Comary, 26/VIII/2002, R. Marquete, N. Marquete, L.C. Giordano, M.C. Valente & J.C. Silva 3381

(RB). SÃO PAULO: Garulhos, Parque Estadual da Cantareira, núcleo Cabuçu, trilha da Cachoeira, 11/VIII/2005, F.A.R.D.P. Arzolla, G.C.R. de Paula, F.E.S.P. Vilela e J.R. Santos 918 (RB); Mogi das Cruzes, serra do Mar, 16/IX/1983, M. Kirizawa, A.V.G. Sousa, N.N. Duque & M.R. Silva 1058 (RB); Paranapiacaba, Estação Biológica, 28/VIII/1983, A. Custódio Filho & C.B. Toledo 1399 (RB); São Paulo, Reserva Biológica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, 24/X/1979, M. Kirizawa 503 (RB); idem, 24/X/1979, M. Kirizawa 505 (RB); Tapiraí, 12 Km de Tapiraí em direção a Juquiá, cachoeira do Chá, 09/IX/1994, M.R. Gorenstein, C.D. Sanches, E.B. Bastos, J.R.R. Hoffmann & V.F. Pereira 41 (RB).

Piper cernuum Vell.

BRASIL. BAHIA: Lençóis, Chapadinha, meio da mata do grotão, fendas da serra do Brejão, 25/IV/1995, M.C. Ferreira, A. Pereira, J. Costa & E. Melo 1805 (RB); idem, na mata do grotão, 23/II/2003, A. Rapini & P. Fiaschi 1024 (RB). ESPÍRITO SANTO: Marechal Floriano, sítio das Pacas, s/d, J. Luber s/n (RB). MINAS GERAIS: Araponga, serra de Araponga, fazenda Neblina, 01/II/1992, L.S. Leoni s/n (RB); Lima Duarte, Parque Estadual do Ibitipoca, 23/III/1988, P.M. Andrade & M.A. Drumond 1132 (RB). RIO DE JANEIRO: Rio de Janeiro, Jardim Botânico, 08/V/1968, E.F. Guimarães & C.B. Abreu 168 (RB).

Piper chimonanthifolium Kunth

BRASIL. MINAS GERAIS: Viçosa, Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, 23/IX/2014, A. Valentin-Silva 81 (BOTU). RIO DE JANEIRO: Itatiaia, estrada Maromba, Km 2,5, 06/X/1945, A.B. Pereira & Walter 95 (RB); Teresópolis, Pimenteiras, 05/IX/1996, E.F. Guimarães et al. 1609/09 (RB); idem, cascata perto do ponto final de ônibus, 17/X/1989, E.F. Guimarães 142 (RB); idem, rodovia Rio/Mendon, 09/XII/1987, E.F. Guimarães & L. Mautone 19 (RB). SÃO PAULO: Biritiba Mirim, Estação Biológica de Boréia, 29/IX/1983, A. Custódio Filho 1572 (UB); Boa Esperança do Sul, fazenda Itaquerê, 07/VII/1964, J.C. Gomes Jr. 2059 (UB).

CAPÍTULO 4

Dinâmicas de liberação de pólen e exposição estigmática em espécies neotropicais de *Piper*: um possível padrão para o gênero

PREMISSA DO ESTUDO: Dicogamia é uma característica comum nas angiospermas basais e está relacionada com a eficácia da polinização. Para melhor compreender a reprodução sexual em espécies de *Piper*, determinamos se existe um padrão de liberação de pólen e exposição estigmática em espécies neotropicais do gênero, independentemente dos números de estames e carpelos e da sexualidade da flor.

MÉTODOS: Realizamos o estudo em 16 espécies neotropicais de *Piper*, que possuem flores com diferentes números de estames e carpelos. Analisamos os eventos florais, em campo e em laboratório, desde botão até flores senescentes.

RESULTADOS CHAVE: Doze espécies tinham apenas flores bissexuais e quatro espécies tinham flores bissexuais e estaminadas. As flores bissexuais de todas as espécies analisadas apresentaram protoginia incompleta: a fase pistilada da flor durou de 2-7 dias e a fase bissexuada durou de 1-9 dias. Os estigmas foram longevos (4-16 dias) e as papilas estigmáticas foram expostas sequencialmente e gradualmente em sentido basípeto, independente do número de carpelos na flor. A deiscência das anteras foi assincrônica e sequencial, ocorrendo em um estame por vez, independente do número de estames e da sexualidade da flor.

CONCLUSÕES: A dinâmica dos eventos florais apresentou o mesmo padrão para todas as 16 espécies estudadas. Esses resultados sugerem um padrão para as espécies neotropicais de *Piper*, considerando que as espécies analisadas pertencem a diferentes clados do gênero. Como o desenvolvimento floral e a morfologia das flores bissexuais e unissexuais são similares, essas características devem representar um padrão para o gênero como um todo.

PALAVRAS-CHAVE: dicogamia, liberação de pólen assincrônica, longevidade estigmática, protoginia incompleta

* Manuscrito submetido para a revista “*American Journal of Botany*”.

INTRODUÇÃO

A dicogamia, principalmente a protoginia, é uma característica comum nas angiospermas basais, está relacionada com a eficácia da polinização (Endress, 2010) e pode influenciar a diversidade genética da população (Li et al., 2016). Além disso, a protoginia pode atuar como um mecanismo eficaz para prevenir a autogamia em espécies autocompatíveis (Lloyd e Webb, 1986; Bertin e Newman, 1993). No entanto, a protoginia não impede a geitonogamia, se flores em fases distintas ocorrem em uma planta (Pang e Saunders, 2014 e referências nele contidas). Como as espécies de *Piper* são polinizadas por pequenos insetos que procuram por pólen (Figueiredo e Sazima, 2000; capítulo 2), é essencial conhecer a dinâmica dos eventos florais para melhor compreender a reprodução sexual nessas espécies, especialmente o período em que o pólen está disponível para os polinizadores e o período durante o qual o pólen pode ser depositado em um estigma receptivo.

O gênero *Piper* possui distribuição pantropical e as espécies diferem quanto à sexualidade de suas flores: as espécies neotropicais possuem flores bissexuais e as paleotropicais, flores unissexuais (Jaramillo et al., 2008). Entretanto, flores funcionalmente unissexuais (estaminadas) foram observadas em *Piper arboreum* Aubl., espécie neotropical que é andromonoica (Figueiredo e Sazima, 2000). Apesar disso, as flores bissexuais e as unissexuais são morfológicamente similares, aperiantadas, protegidas por uma bráctea, com 1-10 estames e 3-4 carpelos (Jaramillo e Manos, 2001).

Estudos ontogenéticos em espécies com quatro e seis estames mostraram que os pares laterais de estames se desenvolvem simultaneamente, enquanto o par mediano se desenvolve de forma sequencial, com o estame mediano anterior sendo formado antes do mediano posterior (Tucker, 1982). A liberação de pólen também ocorre de forma assíncrona, em um estame por vez, como descrito por Valentin-Silva et al. (2015) em *P. vicosanum* Yunck., espécie com quatro estames. Entretanto, a liberação de pólen pelos dois primeiros estames não é simultânea, diferindo da sequência de desenvolvimento proposta por Tucker (1982); os outros dois estames liberam pólen nos dias subsequentes de forma sequencial.

A maioria das espécies desse gênero é protogínica e os estigmas são longevos (Menon, 1949; Martin e Gregory, 1962; Figueiredo e Sazima, 2000; Valentin-Silva et al., 2015). Informações sobre o modo de exposição das papilas estigmáticas se restringe ao estudo de Valentin-Silva et al. (2015), que mostraram que as papilas estigmáticas são expostas de forma sequencial e gradual em sentido basípeto.

Dessa forma, objetivamos verificar se existe um padrão de liberação de pólen e de exposição estigmática nas espécies neotropicais de *Piper*. Para tanto, descrevemos esses

eventos florais em espécies de *Piper* com diferentes números de estames e de carpelos e em diferentes tipos florais (flores bissexuais e estaminadas). Como a organização floral é uma característica considerada conservativa (Soltis et al., 2005) e a morfologia floral das espécies de *Piper* é similar (Jaramillo et al., 2008), esperamos que a liberação de pólen e a exposição estigmática sejam semelhantes entre as espécies e que, nas espécies com dois tipos florais, a dinâmica de liberação de pólen seja similar entre as flores bissexuais e as estaminadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizamos o estudo de abril de 2014 a dezembro de 2015 na ‘Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso’, reserva florestal situada em Viçosa (20°47'-48'S, 42°50'-52'O), Minas Gerais, sudeste do Brasil. Essa reserva possui 194 ha de área e altitudes variando entre 690 e 870 m. Sua vegetação é classificada como floresta estacional semidecídua montana (Veloso et al., 1991).

Estudamos 16 espécies de *Piper* (Tabela 1). A maioria das espécies possui inflorescência do tipo espiga, com flores bissexuais, sésseis, androceu com quatro estames, gineceu tricarpelar (o estilete geralmente está ausente), ovário súpero e uniovular (Yuncker, 1972, 1973). As espécies estudadas pertencem a diferentes clados do gênero (Jaramillo et al., 2008; Tabela 1). Depositamos material testemunho no acervo do Herbário BOTU, Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista, câmpus de Botucatu (Apêndice 1).

Percorremos cerca de 5 km de transecções na área e marcamos os indivíduos que tinham estruturas reprodutivas (inflorescências com botões florais, flores ou frutos) ou cicatrizes de inflorescências, como sugerido por Valentin-Silva e Vieira (2015). Quando foi possível, sorteamos 15 plantas dentre as marcadas de cada espécie (Tabela 1) para analisar as flores em campo, com auxílio de lupa de mão (aumento de 60X), e em laboratório, sob estereomicroscópio (flores frescas ou fixadas em etanol 70%), para verificar a presença de tipos florais diferentes e caracterizar as dinâmicas de liberação de pólen e exposição estigmática. Fizemos observações diárias durante o período de floração de cada espécie (veja capítulo 1), em duas inflorescências por indivíduo. O monitoramento da exposição das papilas estigmáticas serve como indicativo da receptividade dos estigmas (Valentin-Silva et al., 2015). Essas informações, quando associadas com o período de liberação de pólen, auxiliam na determinação do tipo de dicogamia, quando presente.

TABELA 1. Espécies de *Piper* estudadas e clado a que pertencem na filogenia, tipo de inflorescência, número de estames e de estigmas na flor e número de plantas amostradas.

Espécie	Clado	Inflorescência	Estames	Estigmas	Plantas
<i>Piper aduncum</i> L.	Radula	espiga	4	3	13
<i>P. amplum</i> Kunth	Radula	espiga	6	3	11
<i>P. anisum</i> (Spreng.) Angely	Otonia	racemo	4	4	12
<i>P. arboreum</i> Aubl.	Macrostachys	espiga	4	3	10
<i>P. caldense</i> C. DC.	Peltobryon	espiga	4	3	15
<i>P. cernuum</i> Vell.	Macrostachys	espiga	4	3	14
<i>P. chimonanthifolium</i> Kunth	Radula	espiga	4	3	10
<i>P. corcovadensis</i> (Miq.) C. DC.	Otonia	racemo	4	4	15
<i>P. crassinervium</i> Kunth	Radula	espiga	4	3	11
<i>P. gaudichaudianum</i> Kunth	Radula	espiga	4	3	12
<i>P. hispidum</i> Sw.	Radula	espiga	4	3	15
<i>P. lucaeanum</i> Kunth	Schilleria	espiga	3	3	15
<i>P. malacophyllum</i> (C. Presl) C. DC.	Radula	espiga	4	3	10
<i>P. mollicomum</i> Kunth	Radula	espiga	4	3	8
<i>P. pubisubmarginalum</i> Yunck.	Schilleria	espiga	3	3	15
<i>P. umbellatum</i> L.	Pothomorphe	espigas em umbela	2	3	15

Para exemplificar as dinâmicas de liberação de pólen e de exposição estigmática, coletamos amostras de *P. amplum*, desde botões florais até flores senescentes. Essa espécie é a que possui maior número de estames entre as analisadas (Tabela 1) e devido à semelhança entre os resultados preliminares obtidos nas nossas análises e os resultados obtidos por Valentin-Silva et al. (2015) a usamos como modelo. Fixamos as amostras em FAA (formaldeído, ácido acético e etanol 50%, 1:1:18 v/v/v) por 48h e estocamos em etanol 70% (Johansen, 1940). Observamos e capturamos as imagens em esteromicroscópio com câmara acoplada.

RESULTADOS

Doze espécies tinham apenas flores bissexuais e quatro espécies tinham flores bissexuais e estaminadas. A dinâmica dos eventos florais apresentou o mesmo padrão para as flores bissexuais de todas as 16 espécies estudadas, independente do número de estames e de carpelos na flor. As flores bissexuais apresentaram protoginia incompleta. A fase pistilada das flores durou de 2-7 dias e variou entre flores de um mesmo indivíduo. A fase bissexuada das flores durou de 1-9 dias. Os estigmas foram longevos (4-16 dias) e as papilas estigmáticas foram expostas de forma sequencial e gradual em sentido basípeto. A deiscência das anteras foi assincrônica e sequencial, ocorrendo em um estame por vez. O início da senescência estigmática foi variável, tanto entre espécies quanto entre inflorescências da mesma espécie. Observamos que a senescência estigmática, caracterizada pelo escurecimento dos estigmas, pode começar no fim da fase pistilada ou durante a fase bissexuada da flor.

Observamos em *P. arboreum*, *P. caldense*, *P. cernuum* e *P. chimonanthifolium* dois tipos florais (flores bissexuais e estaminadas). As flores funcionalmente unissexuais são morfológicamente similares às flores bissexuais: elas têm uma bráctea, quatro estames com anteras ditecas e um pistilódio (pistilo reduzido e não funcional). Nessas flores, a deiscência das anteras foi assincrônica e sequencial, ocorrendo em um estame por vez, e o período de liberação de pólen foi similar ao das flores bissexuais. Não observamos variações no pistilódio ao longo do período de antese e essas flores não frutificaram.

Nas flores bissexuais de *P. amplum*, a bráctea cobria totalmente o androceu e o gineceu durante a fase de botão floral. Com o início da retração da bráctea, os ápices das anteras de três estames se tornaram visíveis: estames 1 e 2 (par lateral-posterior) e estame 3 (estame mediano-anterior, localizado entre os dois primeiros) (Fig. 1A). Nessa ocasião, o estame 4 (estame mediano-posterior, localizado entre a bráctea e o ovário) ainda estava oculto pela bráctea; os estames 5 e 6 (par lateral-anterior) também não eram visíveis. Em média, sete

dias após o início da retração da bráctea, os estigmas justapostos e eretos se tornaram visíveis entre os estames (Fig. 1B). O estame 4 tornou-se visível, assim como os estames 5 e 6 (Fig. 1B), devido à retração da bráctea.

A antese se iniciou com a receptividade dos estigmas, caracterizada pela exposição de papilas túrgidas na porção distal (localizadas na superfície ventral dos estigmas; Fig. 1C), enquanto as porções mediana e proximal dos estigmas estavam justapostas. As anteras de todos os estames permaneceram indeiscentes. Então, a espécie foi protogínica, pois a receptividade estigmática começou antes da liberação de pólen. A fase pistilada das flores durou de 2-7 dias e variou entre flores de um mesmo indivíduo.

A liberação de pólen começou em flores com estigmas ainda receptivos, indicando protoginia incompleta e caracterizando a fase bissexuada da flor. O pólen foi liberado nas horas mais quentes do dia, geralmente entre 10 e 14h, formando grumos sobre a antera, que podiam permanecer sobre as mesmas por mais de 24 horas.

Os estames 1 e 2 foram os primeiros a liberar pólen, porém de forma assincrônica. O estame prestes a liberar pólen se tornou mais alto que o outro, devido à total exposição de filete e antera; tanto o estame 1 quanto o estame 2 pode ser o primeiro a liberar pólen (Fig. 1E-H). Esses estames liberaram pólen no mesmo dia, mas em horários diferentes, com pelo menos uma hora de diferença (Fig. 1D). Outra possibilidade foi a liberação em dias consecutivos, geralmente pela manhã, com cerca de 24 horas de diferença.

Nessa ocasião, os estigmas estavam mais afastados entre si, expondo as papilas das porções distal e mediana dos estigmas. Por outro lado, as papilas estigmáticas localizadas na porção distal dos estigmas podiam estar escurecidas e flácidas (Fig. 1E-H), caracterizando o início da senescência estigmática nessa porção.

Um dia após a liberação de pólen pelos estames 1 e 2, geralmente ocorreu a abscisão da antera e de parte do filete (Fig. 1I). Nessa ocasião, o estame 3 estava mais exposto e podia liberar pólen (Fig. 1J) ou podia permanecer indeiscente e liberar pólen no dia subsequente. Os estigmas estavam quase completamente expostos e as papilas das porções distal e mediana já estavam escurecidas em parte das flores na inflorescência. A partir desse estágio, a extensão dos estigmas que estava escurecida foi variável entre as flores.

Um dia após a liberação de pólen pelo estame 3, restavam na flor três estames com anteras indeiscentes (Fig. 1K). Nessa ocasião, o estame 4 podia liberar pólen (Fig. 1L) ou podia permanecer indeiscente e liberar pólen no dia subsequente, apresentando variação semelhante à do estame 3. Os estames 5 e 6 estavam mais visíveis nesse momento (Fig. 1L) devido à abscisão dos estames que já liberaram pólen. Nessa fase, os estigmas geralmente possuíam papilas túrgidas apenas na porção proximal.

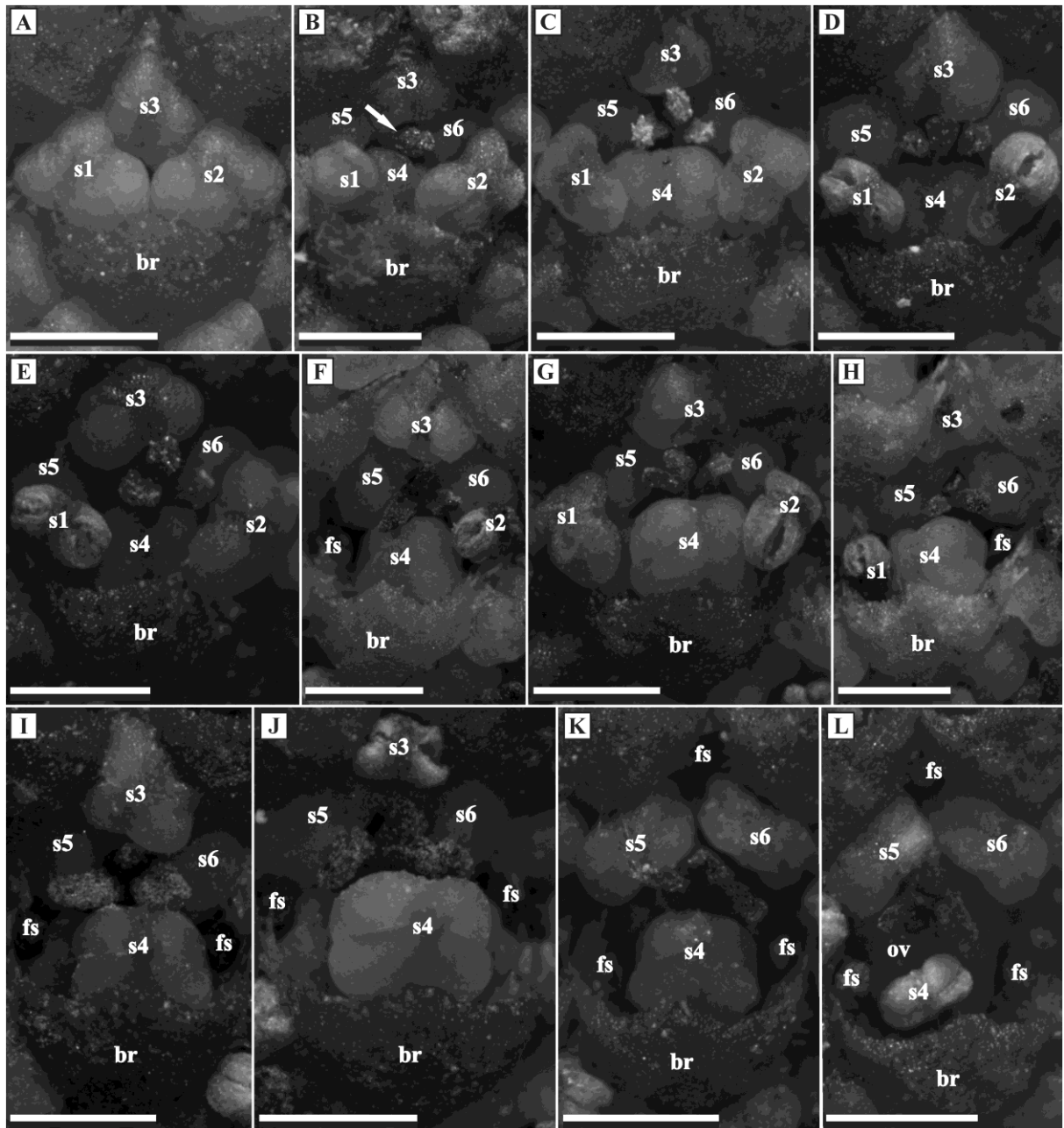


FIGURA 1. Flores de *Piper amplum* em botão, na fase pistilada e no começo da fase bissexuada. (A) Começo da exposição dos estames. (B) Botão floral com os estigmas entre as anteras (seta). (C) Exposição parcial dos seis estames e das papilas na porção distal dos estigmas. (D) Liberação de pólen pelos estames 1 e 2 no mesmo dia. (E-F) Liberação de pólen pelos estames 1 e 2 em dias subsequentes, começando pelo estame 1. (G-H) Liberação de pólen pelos estames 1 e 2 em dias subsequentes, começando pelo estame 2. (I) Flor após liberação de pólen pelos estames 1 e 2. (J) Liberação de pólen pelo estame 3 e estigmas quase completamente expostos. (K) Flor após liberação de pólen pelo estame 3. (L) Liberação de pólen pelo estame 4 e papilas túrgidas na porção proximal dos estigmas. O ápice da bráctea

está direcionado para a região distal da espiga. br, bráctea; fs, cicatriz do filete; ov, ovário; s1, estame 1; s2, estame 2; s3, estame 3; s4, estame 4; s5, estame 5; s6, estame 6. Barras: 500 µm.

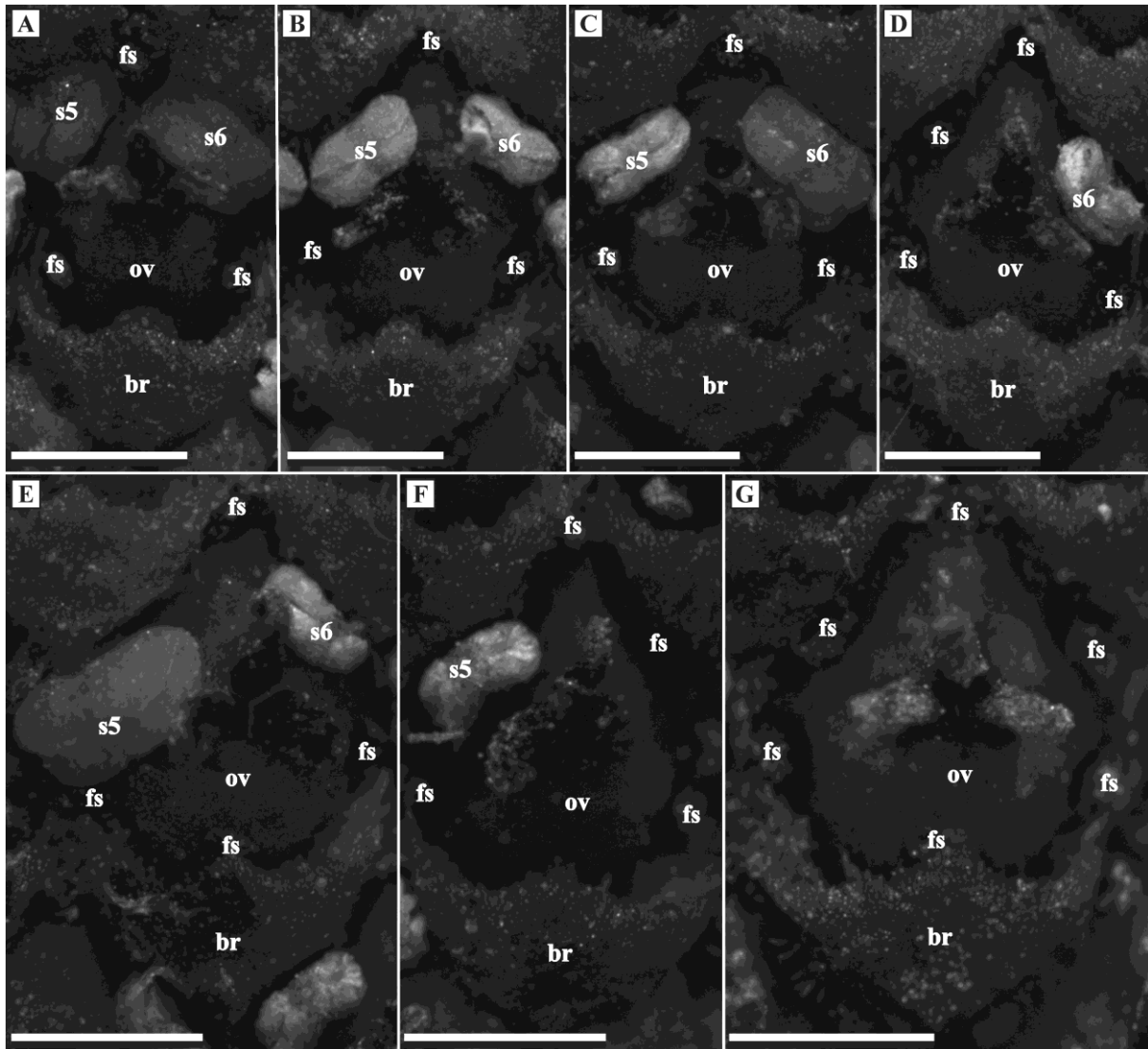


FIGURA 2. Flores de *Piper amplum* no fim da fase bissexuada. (A) Flor após liberação de pólen pelo estame 4. (B) Liberação de pólen pelos estames 5 e 6 no mesmo dia. (C-D) Liberação de pólen pelos estames 5 e 6 em dias subsequentes, começando pelo estame 5. (E-F) Liberação de pólen pelos estames 5 e 6 em dias subsequentes, começando pelo estame 6; observe os estigmas colapsados. (G) Fruto imaturo. O ápice da bráctea está direcionado para a região distal da espiga. br, bráctea; fs, cicatriz do filete; ov, ovário; s5, estame 5; s6, estame 6. Barras: 500 µm.

Um dia após a liberação de pólen pelo estame 4, os estames 5 e 6 estavam mais expostos e puderam liberar pólen (Fig. 2A). A variação na liberação de pólen foi semelhante à observada nos estames 1 e 2 (Fig. 2B-F). Nessa ocasião, a maioria das flores estava com os

estigmas totalmente escurecidos, indicando o fim da receptividade estigmática. Entretanto, algumas poucas flores podiam ter estigmas ainda receptivos.

A assincronia na abertura das anteras resulta em variações no período de liberação de pólen entre os estames, que pode variar de 4-9 dias. Após a abscisão dos estames 5 e 6, os estigmas estavam colapsados. Então, ocorreu o aumento de tamanho do ovário durante a frutificação (Fig. 2G), se a flor foi fertilizada.

DISCUSSÃO

A protoginia incompleta, como aqui observado, pode favorecer a polinização cruzada durante a fase pistilada, mas não impede que ocorra a autopolinização durante a fase bissexuada da flor (Lloyd e Webb, 1986; Bertin e Newman, 1993; Endress, 2010; Li et al., 2016). Dessa forma, outros mecanismos reprodutivos devem estar associados à dicogamia, por exemplo, a autoincompatibilidade, evitando a autogamia. Essa combinação de protoginia incompleta e autoincompatibilidade foi observada em 13 espécies de *Piper* do sudeste brasileiro (Figueiredo e Sazima, 2000; capítulo 2).

A exposição das papilas estigmáticas de forma gradual e sequencial está relacionada tanto com a protoginia incompleta quanto com a longevidade dos estigmas (Valentin-Silva et al., 2015), características observadas em todas as espécies analisadas. Estigmas longevos são comuns em espécies de *Piper* (Menon, 1949; Martin e Gregory, 1962; Figueiredo e Sazima, 2000; Valentin-Silva et al., 2015), assim como o modo de exposição de suas papilas, como aqui demonstrado. O longo período de receptividade estigmática tem sido relacionado com a maior probabilidade dos estigmas receberem grãos de pólen suficientes (Cruden, 2000), o que pode favorecer a reprodução sexuada.

O modo de exposição das papilas estigmáticas deve ser filogeneticamente conservado, porque foi independente do número de carpelos na flor. Foi observado em espécies com quatro estigmas, a condição ancestral em Piperaceae (Jaramillo et al., 2004), e em espécies com três estigmas. É possível que esse modo de exposição estigmática também ocorra nas flores pistiladas das espécies paleotropicals de *Piper*, que possuem desenvolvimento do gineceu similar ao descrito para as flores bissexuais das espécies neotropicais (Lei e Liang, 1998).

Devido à exposição sequencial e gradual dos estigmas, um conjunto de papilas receptivas é exposto em sentido basípeto, sugerindo que os estigmas são funcionalmente fragmentados (Valentin-Silva et al., 2015). Além disso, parece haver uma separação funcional entre as porções dos estigmas. As papilas estigmáticas da porção distal devem estar

associadas com o pólen recebido durante a fase pistilada da flor, portanto, oriundo de outras flores, favorecendo a xenogamia ou a geitonogamia, dependendo das dinâmicas de abertura das flores na inflorescência e na planta. Após o início da fase bissexuada da flor e do início da senescência estigmática, que é gradual, as porções mediana e proximal dos estigmas são as que podem receber, além do pólen de outras plantas, seu próprio pólen, caracterizando a autopolinização.

A senescência dos estigmas ocorreu de modo semelhante à exposição das papilas estigmáticas, de forma gradual e sequencial em sentido basípeto, como descrito por Valentin-Silva et al. (2015). O escurecimento dos estigmas observado nas espécies analisadas pode estar relacionado com o acúmulo de compostos fenólicos, como registrado em *P. vicosanum* (Valentin-Silva et al., 2015). A variação no momento de início da senescência estigmática pode estar relacionada com as visitas de polinizadores nas flores de cada espécie. Estigmas não polinizados podem permanecer receptivos por mais tempo do que estigmas polinizados (Devlin e Stephenson, 1984; Richardson e Stephenson, 1989).

Apesar do número de estames ser homoplástico em Piperales (Jaramillo et al., 2004), a liberação de pólen assincrônica e sequencial foi observada em todas as espécies, semelhante ao registrado em *P. vicosanum* (Valentin-Silva et al., 2015), e foi independente do número de estames na flor. No entanto, quanto maior o número de estames na flor, maior foi o período de liberação de pólen. Dessa forma, o período de oferta do recurso floral (pólen) é aumentado, p. ex., na espécie com seis estames, o que pode aumentar as chances de ocorrer polinização cruzada (Li et al., 2016).

Além disso, a liberação de pólen nas quatro espécies com flores estaminadas também foi assincrônica e sequencial. Isso indica que a assincronia na liberação de pólen independe da presença do gineceu e pode ocorrer nas flores estaminadas das espécies paleotropicais de *Piper*, que possuem desenvolvimento do androceu similar ao descrito para as flores bissexuais das espécies neotropicais (Lei e Liang, 1998).

As características observadas aqui (exposição e senescência estigmática de forma sequencial e gradual em sentido basípeto e liberação de pólen assincrônica e sequencial) sugerem um padrão para as espécies neotropicais de *Piper*, considerando que as espécies analisadas pertencem a diferentes clados do gênero e essas características devem ser filogeneticamente conservadas. Não existem estudos semelhantes com espécies paleotropicais de *Piper*, o que impossibilita a comparação direta com essas espécies. Apesar disso, como o desenvolvimento floral e a morfologia das flores bissexuais e unissexuais são similares entre espécies neotropicais e paleotropicais de *Piper* (Tucker, 1982; Lei e Liang, 1998; Jaramillo et

al., 2008), as características aqui descritas devem representar um padrão para o gênero como um todo.

LITERATURA CITADA

- BERTIN, R. I., AND C. M. NEWMAN. 1993. Dichogamy in angiosperms. *Botanical Review* 59: 112-152.
- CRUDEN, R. W. 2000. Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution* 222: 143-165.
- DEVLIN B., AND A. G. STEPHENSON. 1984. Factors that influence the duration of the staminate and pistillate phases of *Lobelia cardinalis* flowers. *Botanical Gazette* 145: 323-328.
- ENDRESS, P. K. 2010. The evolution of floral biology in basal angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 411-421.
- FIGUEIREDO, R. A., AND M. SAZIMA. 2000. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany* 85: 455-460.
- JARAMILLO, M. A., AND P. MANOS. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* 88: 706-716.
- JARAMILLO, M. A., R. CALLEJAS, C. DAVIDSON, J. F. SMITH, A. C. STEVENS, AND E. TEPE. 2008. A phylogeny of the tropical Genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron *psbJ-petA*. *Systematic Botany* 33: 647-660.
- JARAMILLO, M. A., P. S. MANOS, AND E. A. ZIMMER. 2004. Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. *International Journal of Plant Sciences* 165: 403-416.
- JOHANSEN, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw Hill, New York, New York, USA.
- LEI, L. G., AND H. X. LIANG. 1998. Floral development of dioecious species and trends of floral evolution in *Piper sensu lato*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 127: 225-237.
- LI, P. S., C. C. PANG, AND R. M. K. SAUNDERS. 2016. Contrasting pollination ecology of *Disepalum* species (Annonaceae): evolutionary loss of the floral chamber and partial breakdown of protogyny associated with a shift in pollination system. *Botanical Journal of the Linnean Society* 182: 708-718.
- LLOYD, D. G., AND C. J. WEBB. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 135-162.

- MARTIN, F. W., AND L. E. GREGORY. 1962. Mode of pollination and factors affecting fruit set in *Piper nigrum* L. in Puerto Rico. *Crop Science* 2: 295-299.
- MENON, K. K. 1949. The survey of *pollu* and root diseases of pepper. *Indian Journal of Agricultural Science* 19: 89-136.
- PANG, C. C., AND R. M. K. SAUNDERS. 2014. The evolution of alternative mechanisms that promote outcrossing in Annonaceae, a self-compatible family of early-divergent angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society* 174: 93-109.
- RICHARDSON, T. E., AND A. G. STEPHENSON. 1989. Pollen removal and pollen deposition affect the duration of the staminate and pistillate phases in *Campanula rapunculoides*. *American Journal of Botany* 76: 532-538.
- SOLTIS, D. E., P. S. SOLTIS, P. K. ENDRESS, AND M. W. CHASE. 2005. Phylogeny and evolution of angiosperms. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- TUCKER, S. C. 1982. Inflorescence and flower development in the Piperaceae III. Floral ontogeny of *Piper*. *American Journal of Botany* 69: 1389-1401.
- VALENTIN-SILVA, A., AND M. F. VIEIRA. 2015. Phenology of two co-occurring *Piper* (Piperaceae) species in Brazil. *Australian Journal of Botany* 63: 581-589.
- VALENTIN-SILVA, A., V. P. M. COELHO, M. C. VENTRELLA, AND M. F. VIEIRA. 2015. Timing of pollen release and stigma receptivity period of *Piper vicosanum* (Piperaceae): new insights into sexual reproduction of the genus. *American Journal of Botany* 102: 626-633.
- VELOSO, H. P., A. L. R. RANGEL FILHO, AND J. C. A. LIMA. 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
- YUNCKER, T. G. 1972. The Piperaceae of Brazil - I *Piper* group I, II, III,IV. *Hoehnea* 2: 19-366.
- YUNCKER, T. G. 1973. The Piperaceae of Brazil II: *Piper*: Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorrhachis*. *Hoehnea* 3: 29-284.

APÊNDICE 1. Número de registro no Herbário BOTU.

Piper aduncum: 32.180 (Valentin-Silva 101), 32.198 (Valentin-Silva 83)

Piper amplum: 32.187 (Valentin-Silva 94), 32.194 (Valentin-Silva 87)

Piper anisum: 32.188 (Valentin-Silva 93)

Piper arboreum: 32.181 (Valentin-Silva 100)

Piper caldense: 32.195 (Valentin-Silva 86), 32.201 (Valentin-Silva 79)

Piper cernuum: 32.172 (Valentin-Silva 109), 32.200 (Valentin-Silva 80)

Piper chimonanthifolium: 32.196 (Valentin-Silva 85), 32.199 (Valentin-Silva 81)

Piper corcovadensis: 32.191 (Valentin-Silva 90)

Piper crassinervium: 32.175 (Valentin-Silva 106), 32.177 (Valentin-Silva 104)

Piper gaudichaudianum: 32.173 (Valentin-Silva 108), 32.183 (Valentin-Silva 98)

Piper hispidum: 32.174 (Valentin-Silva 107), 32.184 (Valentin-Silva 97)

Piper lucaeanum: 32.182 (Valentin-Silva 99), 32.193 (Valentin-Silva 88)

Piper malacophyllum: 32.178 (Valentin-Silva 103), 32.185 (Valentin-Silva 96)

Piper mollicomum: 32.179 (Valentin-Silva 102), 32.190 (Valentin-Silva 91)

Piper pubisubmarginalum: 32.192 (Valentin-Silva 89)

Piper umbellatum: 32.176 (Valentin-Silva 105)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As respostas fenológicas de plantas podem ser moduladas por fatores abióticos e pelas restrições filogenéticas. No capítulo 1, registramos nas espécies de *Piper*, estudadas em uma floresta estacional semidecídua, que apenas a floração apresentou sinal filogenético e foi estacional. A frutificação foi influenciada por fatores abióticos, enquanto a floração teve uma influência compartilhada de fatores abióticos e das restrições filogenéticas. Assim, mesmo em ambientes estacionais, pode haver influência da filogenia nos eventos reprodutivos. A presença de sinal filogenético na floração pode estar relacionada com o predomínio da frequência anual dessa fenofase nas espécies de *Piper* aqui estudadas e também em outros tipos de vegetação. Estudos futuros, que amostram um mesmo conjunto de espécies em diferentes populações e na mesma escala temporal, poderão testar essa ideia.

As espécies de *Piper* são entomófilas e foram visitadas por insetos de diferentes ordens, portanto são ecológica e funcionalmente generalistas. Não houve correlação entre os caracteres florais e os dos visitantes florais, o que sugere que os caracteres florais analisados não representam adaptações aos polinizadores. Portanto, corroboramos a ideia de que a diversificação floral em espécies generalistas é pouco influenciada pelas pressões seletivas exercidas pelos polinizadores. Além dos polinizadores, outros fatores podem estar relacionados com a diversificação floral e poderão ser testados futuramente.

No capítulo 3, observamos variações do hermafroditismo em quase 25% das espécies aqui estudadas. Registramos a presença de flores funcionalmente unissexuais masculinas em quatro das 17 espécies analisadas. Como a morfologia floral das espécies de *Piper* é similar, esses resultados reforçam a necessidade de estudos em campo que avaliem a funcionalidade das flores ao longo da antese para determinar a expressão sexual das flores e das plantas. Em decorrência disso, outras espécies não hermafroditas poderão ser encontradas no Neotrópico.

Ao analisarmos as dinâmicas de liberação de pólen e de exposição estigmática, registramos padrão similar entre as espécies. Como essas espécies pertencem a diferentes clados do gênero, esse padrão deve ocorrer em outras espécies neotropicais. Temos evidências que o mesmo pode ocorrer nas espécies paleotropicais, devido à similaridade do desenvolvimento floral e da morfologia das flores bissexuais e unissexuais. Entretanto, seria interessante que estudo semelhante fosse realizado com espécies paleotropicais para confirmar os resultados aqui encontrados como um padrão para o gênero.