

DIANA LUCIA VARGAS ROJAS

**EXPRESSÃO SEXUAL, POLINIZADORES E SISTEMA REPRODUTIVO
EM *Piper caldense* C. DC. (PIPERACEAE) EM FRAGMENTO DE
FLORESTA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica para obtenção do título *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Vargas Rojas, Diana Lucia, 1988-
V297e Expressão sexual, polinizadores e sistema reprodutivo em
2015 *Piper caldense* C. DC. (Piperaceae) em fragmento de Floresta
Atlântica / Diana Lucia Vargas Rojas. – Viçosa, MG, 2015.
x, 27f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Milene Faria Vieira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.23-27.

1. Jaborandi. 2. *Piper caldense* C. DC. 3. Plantas -
Reprodução. 4. Polinização por inseto. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 575.6

DIANA LUCIA VARGAS ROJAS

**EXPRESSÃO SEXUAL, POLINIZADORES E SISTEMA REPRODUTIVO
EM *Piper caldense* C. DC. (PIPERACEAE) EM FRAGMENTO DE
FLORESTA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de janeiro de 2015.

Andreza Viana Neri

Lúcio Antônio de Oliveira Campos

Milene Faria Vieira
(Orientadora)

*Para minha Querida Família, que
apesar da distância, sempre esteve muito presente.*

AGRADECIMENTOS

Ao curso de pós-graduação em Botânica do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) e à Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo apoio logístico ao projeto.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e à Capes pela bolsa de estudos.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pela atenciosa colaboração.

Ao laboratório de Anatomia Vegetal da UFV e, em especial, à Andrea Lanna pela ajuda com as análises anatômicas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica/ UFV por colaborar com minha formação como Mestra em Botânica.

À minha orientadora, Milene Faria Vieira, pela orientação, ensinamentos, sugestões e muita paciência ao longo da minha maestria.

Ao meu “coorientador” e companheiro em campo, Adriano Valentin, por TODA sua ajuda e por me ensinar tudo o que sei das *Piper*, pela paciência e aulas de português.

Ao professor Lúcio Antônio de Oliveira Campos por sua ajuda na identificação dos himenópteros coletados.

Ao meu amigo Manuel Solís por sua ajuda na identificação dos dípteros coletados.

Aos meus companheiros do Laboratório de Sistemática e Reprodução de Fanerógamas por sua companhia, ajuda incondicional e risos nos momentos de estresse.

À minha família que, desde sempre, me incentivou e apoiou.

Aos amigos Maurício, Fernanda e Mary pelo companheirismo, amizade e apoio incondicional e por me fazer sentir como em casa.

Aos meus amigos Karen, Laura, Silvana, Álvaro, Diego e Guillo por se tornarem minha família aqui em Viçosa e fazer os dias mais felizes e intensos.

Por último, mas não menos importante, ao Dani por seu amor e apoio sempre.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

DIANA LUCIA VARGAS ROJAS, filha de Tito Levi Vargas e Maria Lucia Rojas, nascida em 05 de janeiro de 1988, em Bogotá, Colômbia.

Em dezembro de 2004, concluiu o ensino médio no Colégio Apresentação.

Em agosto de 2005, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas, na Universidade Pedagógica e Tecnológica da Colômbia, onde concluiu o curso em setembro de 2011.

Em abril de 2013, ingressou no curso de Pós-Graduação em Botânica, na área de biologia reprodutiva de fanerógamas, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

VARGAS ROJAS, Diana Lucia, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2015. **Expressão sexual, polinizadores e sistema reprodutivo em *Piper caldense* C. DC. (Piperaceae) em fragmento de Floresta Atlântica.** Orientador: Milene Faria Vieira.

Piper inclui mais de 1.000 espécies e 285 delas ocorrem no Brasil. Apesar da riqueza em espécies e importância ecológica em florestas brasileiras, por ser um dos mais importantes componentes de sub-bosques, estudos realizados sobre a biologia reprodutiva em *Piper* são escassos. Entre os aspectos analisados, o hermafroditismo tem sido considerado um atributo reprodutivo basal, mas podem ocorrer variações dessa expressão sexual. Além disso, a dicogamia é comum e a entomofilia e a anemofilia foram registradas ou inferidas. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos da biologia reprodutiva de *Piper caldense* C. DC., tais como, a sexualidade e funcionalidade das flores, seu sistema reprodutivo e os polinizadores. O estudo foi realizado em indivíduos de população natural de *P. caldense* na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, em Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais. Foram utilizadas espigas frescas e estocadas em etanol 70% para avaliar a funcionalidade e a dinâmica de exposição das áreas receptivas e da liberação dos grãos de pólen. Informações complementares foram obtidas por meio de estudo morfo-anatômico, utilizando as técnicas usuais de microscopia de luz e eletrônica de varredura. A viabilidade polínica foi testada em 40 espigas utilizando carmim acético. Observações em campo foram feitas para analisar a sexualidade de 50 indivíduos, nos quais se realizaram medições de comprimento e diâmetro em espigas com flores no final da antese. Foram ensacadas 15 espigas para verificar a ocorrência de autopolinização espontânea. A frequência e o comportamento de visita dos polinizadores foram observados durante cinco dias não consecutivos. As inflorescências de *P. caldense* apresentaram dois morfos florais: estaminado e hermafrodita. Cada morfo encontra-se em espigas diferentes. Esses morfos ocorrem num mesmo indivíduo, caracterizando a andromonoiccia; além disso, foram observados indivíduos apenas com espigas com flores estaminadas. A antese das espigas com flores estaminadas antecedeu a antese das espigas com

flores hermafroditas. A dinâmica de liberação de pólen foi assincrônica para os dois morfos. Há protoginia incompleta e a exposição e a senescência das papilas estigmáticas ocorrem de forma gradual e sequencial, em sentido basípeto. Há autoincompatibilidade e, portanto, dependência por polinizadores para que ocorra a frutificação. Quanto aos polinizadores, foram registradas 15 espécies, pertencentes às ordens Hymenoptera e Diptera. Dentre os himenópteros, *Apis mellifera* foi a espécie mais frequente e entre os dípteros, destacou-se *Ocyrtamus* sp.1.

ABSTRACT

VARGAS ROJAS, Diana Lucia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2015. **Sexual expression, pollinators and breeding system in *Piper caldense* C. DC. (Piperaceae) in an Atlantic Forest fragment.** Adviser: Milene Faria Vieira.

Piper includes more than 1,000 species and 285 of them occur in Brazil. Despite of the richness of species and ecological importance in Brazilian forests, for being one of the most important components of understories, research about reproductive biology in *Piper* are scarce. Among the aspects analyzed, hermaphroditism has been considered a basal reproductive attribute, but can occur be variations of this sexual expression. Furthermore, dichogamy is common, entomophily and anemophily were recorded or inferred. The aim of this research was to study the reproductive biology of *Piper caldense* C. DC., such as sexuality and functionality of flowers, reproductive system and pollinators. The study was conducted with plants of a natural *P. caldense* population at the Station of Research, Environmental Training and Education Mata do Paraíso in Viçosa, state of Minas Gerais, in southeastern Brazil. Fresh and stored spikes in 70% ethanol were used to evaluate the functionality and the dynamics of stigmatic exposure and pollen release. Additional information was obtained through morpho-anatomical study using the usual techniques of light and scanning electron microscopy. Pollen viability was tested in 40 spikes using acetic carmine. Field observations were made to analyze the sexuality of 50 individuals in which were measured the length and diameter in spikes with flowers at the end of anthesis. We bagged 15 spikes to verify the occurrence of spontaneous self-pollination. The frequency and the visiting behavior of pollinators were observed during five non-consecutive days. The inflorescences of *P. caldense* had two floral morphs: staminate and hermaphrodite. Each morph is found in different spikes. These morphs occur in the same individual, featuring andromonoecy; besides this, individuals only bearing spikes with staminate flowers were observed. Anthesis of spikes with staminate flowers occurred before anthesis of spikes with hermaphrodite flowers. The dynamic of pollen release was asynchronous in the two morphs. Incomplete protogyny was recorded and the exposure and senescence of stigmatic papillae

occur gradually and in sequence, in basipetal direction. The species is self-incompatible and depends on pollinators for fruit. Were registered 15 species of pollinators belonging to Hymenoptera and Diptera. Among the Hymenoptera, *Apis mellifera* was the most frequent and in Diptera, *Ocyrtamus* sp.1.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 2 |
| 2.1. Área de estudo..... | 2 |
| 2.2. Espécie estudada..... | 3 |
| 2.3. Morfologia floral e biologia floral..... | 4 |
| 2.4. Expressão sexual..... | 5 |
| 2.5. Sistema reprodutivo..... | 6 |
| 2.6. Visitantes florais..... | 6 |
| 2.7. Análises estatísticas..... | 6 |
| 3. RESULTADOS..... | 7 |
| 3.1. Morfologia floral e biologia floral..... | 7 |
| 3.2. Expressão sexual..... | 15 |
| 3.3. Sistema reprodutivo..... | 15 |
| 3.3. Visitantes florais..... | 16 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 19 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 22 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 23 |

1. INTRODUÇÃO

Piperaceae, entre as angiospermas basais, é uma das famílias com maior número de espécies, cerca de 2.500-3.500, e apresenta distribuição pantropical (Quijano-Abril *et al.*, 2006; Wanke *et al.*, 2007). Engloba seis gêneros; *Piper* L. e *Peperomia* Ruiz & Pav. são os dois maiores (Judd *et al.*, 2009). No Brasil, a família está representada por 452 espécies distribuídas nos gêneros *Manekia*, *Ottonia*, *Peperomia* e *Piper s.l.* (= *Piper s.s.* + *Photomorphe* + a maioria das espécies de *Ottonia*; Guimarães *et al.*, 2014).

Representantes de *Piper s.l.* são um dos mais importantes componentes do sub-bosque das florestas tropicais (Kikuchi *et al.*, 2007; Jaramillo *et al.*, 2008), mas também habitam áreas perturbadas, bordas de florestas e clareiras (Thies *et al.*, 1998). O gênero inclui mais de 1.000 espécies arbustivas, herbáceas e trepadeiras e é um dos maiores entre os de angiospermas (Jaramillo & Manos, 2001). Está representado nas florestas brasileiras por 285 espécies, 192 delas endêmicas (Guimarães *et al.*, 2014).

As espécies de *Piper s.l.* possuem, geralmente, inflorescência do tipo espiga, flor bissexuada ou unissexuada, séssil, aclamídea, protegida totalmente por uma bractéola na fase de botão floral. Essa bractéola se retrai gradativamente, expondo os órgãos reprodutivos (Rosa & Souza, 2004; Silva, 2013), e serve como referencial para a localização da porção distal e proximal da inflorescência. A flor apresenta de 1-10 estames e 3-4 carpelos, com 3-4 estigmas, que podem ser sésseis, ovário súpero, séssil ou pedicelado, unilocular com um óvulo basal; o fruto é drupáceo (Yuncker, 1972; 1973; Jaramillo & Manos, 2001).

Estudos realizados sobre os aspectos da biologia reprodutiva em *Piper s.l.* são escassos, apesar da sua riqueza de espécies e importância ecológica em florestas brasileiras. Um desses aspectos, a expressão sexual, é fator de separação entre as espécies paleotropicals e neotropicais. As espécies da Ásia e Pacífico do Sul são dioicas, as da África podem ser monoicas ou dioicas e as neotropicais são hermafroditas (Jaramillo & Manos, 2001). Entretanto, de acordo com Figueiredo (1997), entre as neotropicais podem ocorrer variações, como, por exemplo, a andromonoiccia, como estratégia que maximiza a alocação de recursos na

reprodução. Essa expressão foi descrita para duas espécies, *P. arboreum* Aubl. (Figueiredo & Sazima, 2000) e *P. gaudichaudianum* Kunth (Silva, 2013).

Nas espécies com flores hermafroditas, a dicogamia, principalmente a protoginia, é comum e a polinização entomófila e a anemófila foram registradas ou inferidas (Menon, 1949; Martin & Gregory, 1962; Semple, 1974; Figueiredo & Sazima, 2000; Thomazini & Thomazini, 2002; Kikuchi *et al.*, 2007; Silva, 2013). Os grupos de insetos polinizadores incluem himenópteros e dípteros. No gênero, a autoincompatibilidade (Prakash *et al.*, 1994; Figueiredo & Sazima, 2000; Kikuchi *et al.*, 2007) e a autocompatibilidade (Marquis, 1988; Figueiredo & Sazima, 2000; Silva, 2013) foram relatadas.

O objetivo foi estudar a biologia reprodutiva de *Piper caldense* em fragmento de Floresta Atlântica do sudeste brasileiro. Para tanto, foram analisados a sexualidade e a funcionalidade de suas flores e o sistema reprodutivo e identificados os visitantes florais e, entre eles, os polinizadores.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

O estudo foi realizado de julho de 2013 a setembro de 2014, no fragmento florestal Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (daqui em diante Mata do Paraíso; 20°48'07"S, 42°51'31"W), no município de Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil (Figura 1). A Mata do Paraíso possui 194 ha e altitudes variando entre 690-870m. É administrada pelo Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

Sua vegetação pertence à formação Floresta Estacional Semidecidual Montana (Veloso *et al.*, 1991), situada dentro dos limites da Floresta Atlântica (Oliveira-Filho & Fontes, 2000). A vegetação remanescente de Viçosa é considerada como uma das áreas prioritárias para conservação, devido a sua importância biológica, classificada como muito alta (Drummond *et al.*, 2005).

O clima de Viçosa é do tipo Cwb (mesotérmico com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos), segundo a classificação de Köppen. De acordo

com a última normal climatológica (1961 a 1990), a estação seca concentra-se entre os meses de abril a setembro, com menos de 60 mm de chuva por mês e temperaturas variando de 10,1 a 26,6 °C; a estação chuvosa inicia-se em outubro e estende-se até março, apresentando pluviosidade maior que 100 mm mensais e temperaturas entre 15,8 e 30 °C.



Figura 1. Localização geográfica Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais, sudeste do Brasil.

2.2. Espécie estudada

Piper caldense C. DC. é arbusto com 2 a 3 metros de altura. Suas folhas são alternas, glabras em ambas as faces e possuem estípulas pouco evidentes. As espigas são eretas e voltadas para abaixo e medem de 3 a 5 cm de comprimento. As flores são protegidas por bractéola triangular subpeltada, franjadas marginalmente; o androceu é composto por quatro estames; o gineceu possui ovário súpero, estilete curto e três estigmas; o fruto é drupa glabra e obovada (Carvalho-Okano & Alves, 1998). Essa espécie é endêmica do Brasil (Guimarães *et al.*, 2014). Material testemunho foi depositado no acervo do Herbário da

Universidade Federal de Viçosa (Herbário VIC), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (VIC 44.516).

Na Mata do Paraíso, os indivíduos de *P. caldense* ocorrem em áreas parcialmente sombreadas do sub-bosque, nas margens da estrada principal ou em áreas úmidas. Todos os indivíduos analisados apresentaram espigas com botões florais ao longo do período de estudo. Essas espigas permaneceram latentes por até 12 meses e apresentavam aproximadamente 0,5 cm de comprimento. As espigas com flores em anteses foram observadas na estação seca, entre agosto e setembro de 2014.

2.3. Morfologia floral e biologia floral

Espigas frescas e estocadas em etanol 70% foram observadas, respectivamente, no campo e sob estereomicroscópio (modelo EZ4D, Leica Microsystems, Deerfield, Illinois, USA). Nelas foram verificadas a presença do androceu e do gineceu e a dinâmica de exposição das áreas receptivas e da liberação dos grãos de pólen. O número de flores por inflorescência foi contado em 10 espigas.

Estudo morfo-anatômico foi conduzido no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, visando obter informações complementares sobre a morfologia floral. Para tanto, espigas foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Posteriormente, seções das porções basal, mediana e apical das espigas foram incluídas em resina hidróxi-etil-metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As seções transversais e longitudinais de 5 µm foram obtidas ao micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems, Deerfield, Illinois, EUA). Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina, pH 4,4 (O'Brien *et al.*, 1964) e montados sob lamínula com resina sintética (Permout, Fisher Scientific, New Jersey, EUA). As lâminas foram observadas em fotomicroscópio (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) equipado com sistema U-Photo com câmara digital acoplada (modelo AxioCamHRc, Zeiss, Göttingen, Alemanha).

A receptividade dos estigmas, caracterizada pela exposição das papilas estigmáticas túrgidas, foi observada em flores de 15 indivíduos, no campo, ao longo de 10 dias consecutivos, com auxílio de lupa de mão (aumento de 30X). Adicionalmente, foram coletadas e fixadas espigas com flores em diferentes estádios da antese para posterior análise em microscópio eletrônico de varredura, no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. As amostras, previamente fixadas em FAA₅₀ e estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940), foram desidratadas em série etanólica crescente e levadas a secagem em ponto crítico de CO₂ (CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Após a montagem das amostras nos suportes metálicos com fita dupla-face, realizou-se a deposição metálica com ouro (FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A análise e a captura de imagens foram realizadas com microscópio eletrônico de varredura (modelo LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Inglaterra).

A dinâmica de liberação do pólen pelos quatro estames foi observada nas mesmas flores utilizadas para caracterizar a receptividade dos estigmas. A viabilidade dos grãos de pólen foi testada com carmim acético (Radford *et al.*, 1974). Para tanto, 40 espigas foram fixadas em FAA₅₀ por 48 horas e, posteriormente, estocadas em etanol 70% (Johansen, 1940). Foram utilizados os estames que se encontravam completamente expostos (sem a proteção da bractéola floral). Em cada lâmina foram colocadas cinco anteras, de estames de flores da mesma espiga, que foram maceradas sobre uma gota de carmim acético. Foram contados 200 grãos por lâmina, separando-os em viáveis e não viáveis (Kearns & Inouye, 1993).

2.4. Expressão sexual

Para definir a sexualidade das plantas, foram analisadas todas as espigas de 50 indivíduos com auxílio de lupa de mão (aumento de 30X). Além da análise das flores, foram realizadas medições, comprimento e diâmetro (porção central da espiga), em espigas com flores no fim da antese.

2.5. Sistema reprodutivo

Seguindo os métodos propostos por Dafni *et al.* (2005), foram realizados os seguintes testes de polinização: autopolinização espontânea – 15 espigas em pré-antese foram ensacadas e permaneceram assim até a formação de frutos ou aborto da inflorescência; polinização aberta – 15 espigas foram marcadas e deixadas expostas à ação dos polinizadores. Para isolar as espigas, foram utilizados sacos confeccionados com tecido failete, que possui a trama completamente fechada. A porcentagem de frutificação desses testes foi calculada considerando o número médio de flores por espiga.

2.6. Visitantes florais

Os insetos observados nas inflorescências foram coletados com auxílio de câmara mortífera. Posteriormente, foram montados em alfinete entomológico e etiquetados. As identificações foram feitas com auxílio de especialistas.

Foi descrito o comportamento dos visitantes florais por meio de observações visuais. Foram anotados dados referentes ao modo de abordagem da inflorescência e horário das visitas. A frequência de visitação foi registrada em cinco dias não consecutivos em agosto de 2014, das 7 às 17 h, totalizando um esforço amostral de 40 horas.

2.7. Análises estatísticas

As medidas citadas anteriormente, assim como as viabilidades dos grãos de pólen, foram submetidas a análise de variância (ANOVA) no programa computacional R, versão 3.0.1 (R Development Core Team, 2010). O número de flores foi avaliado por meio de teste de médias (teste t), usando o mesmo programa.

3. RESULTADOS

3.1. Morfologia floral e biologia floral

As flores estão arranjadas em inflorescências do tipo espiga, com inserção oposta às folhas. Nas espigas, as flores são densamente congestas, sésseis e aclamídeas. Cada flor possui uma bractéola, franjada marginalmente, que envolve completamente a flor e se afasta gradativamente, expondo os órgãos reprodutivos. Na população estudada, *P. caldense* apresentou dois morfos florais, hermafrodita e estaminado.

A flor hermafrodita apresenta o androceu composto por quatro estames, com anteras brancas, basifixas e ditecas (Figura 2A). O gineceu é composto por um pistilo tricarpelar com estigma trifído, ovário súpero, unilocular, uniovular e placentação basal. As flores estaminadas apresentam quatro estames com as mesmas características das flores hermafroditas e um pistilódio (pistilo não funcional e reduzido; Figura 2B).

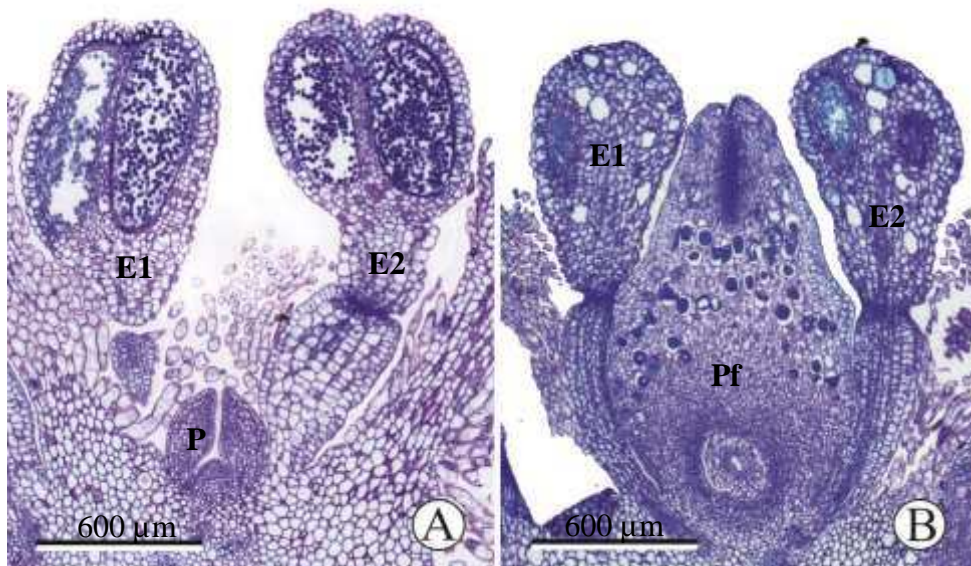


Figura 2. Cortes longitudinais de flores de *Piper caldense*: **A.** flor estaminada; **B.** flor hermafrodita. **E1** estame 1, **E2** estame 2, **P** pistilódio, **Pf** pistilo funcional.

Não foi observada variação na distribuição desses morfos florais ao longo da espiga. Entretanto, as espigas com flores hermafroditas apresentaram, em

média, mais flores do que as com flores estaminadas, respectivamente, $252,8 \pm 27,2$ flores por espiga e $198,3 \pm 27,5$ ($n= 10$ indivíduos para cada morfo floral). Esses valores médios diferiram entre si ($t= - 4,46$, $p = 0,003$).

A sequência de abertura das flores, em geral, ocorreu da base da espiga em direção ao ápice. A abertura nas espigas com flores estaminadas antecedeu a das com flores hermafroditas. O processo de abertura das flores estaminadas e sua antese dura de seis a 14 dias e foi dividido em fases para melhor compressão:

Fase 1: flor estaminada em botão: A flor é protegida pela bractéola que se retrai gradativamente até expor parcialmente as anteras de três estames (Figura 3A); esse processo de exposição dura de dois a três dias. Posteriormente, os estames 1 e 2 estão mais expostos e apresentam altura semelhante; esses estames estão mais altos em relação ao estame 3. A flor pode permanecer nesse estágio por até cinco dias.

Fase 2: primeiro dia de antese. No dia seguinte ao término da fase 1, começa a liberação de pólen. Os estames 1 e 2 são os primeiros a liberar pólen, porém não simultaneamente. Um desses estames torna-se mais alto que o outro, devido à total exposição de filete e antera. O estame que vai liberar pólen apresenta a antera esbranquiçada e túrgida. A liberação de pólen se iniciou no fim da manhã, mas ocorreu, principalmente, pela tarde, por volta das 14 h.

Fase 3: segundo dia de antese. Algumas anteras dos estames 1 e 2 que já haviam liberado pólen apresentam características de senescência, como escurecimento e murcha, enquanto outras ainda apresentam pequenas quantidades de pólen. Além disso, o estame 1 ou 2 que não estava com a antera deiscendo no dia anterior começa a liberar pólen em pequenas porções. A viabilidade polínica média do estame 1 foi de $97,8\% \pm 1,6$ e do estame 2, $97,6\% \pm 1,5$. Nesse estágio, o estame 3 está quase totalmente exposto enquanto o quarto ainda se encontra parcialmente protegido pela bractéola.

Fase 4: terceiro dia de antese. A flor apresenta cicatriz (zona de abscisão entre filete e antera) do primeiro estame que liberou pólen e o segundo estame que liberou pólen pode ter já perdido a antera (Figura 3B) ou pode ter pólen residual sobre a antera. O estame 3, depois de ser exposto totalmente, começa a liberar

pólen, com viabilidade média de $96,1\% \pm 1,8$; o estame 4, por sua vez, torna-se mas visível.

Fase 5: quarto dia de antese. A antera do estame 3 começa a apresentar características de senescência ou já pode ter caído (Figura 3C). A bractéola está completamente retraída, o que permite a total exposição do estame 4 e, conseqüentemente, a liberação de pólen por sua antera. A viabilidade polínica média foi de $97,5\% \pm 2,3$. Algumas flores podem apresentar o estame 4 com pólen residual por até dois dias. As espigas secam e são abortadas, em média, quatro dias após o fim da liberação de pólen.

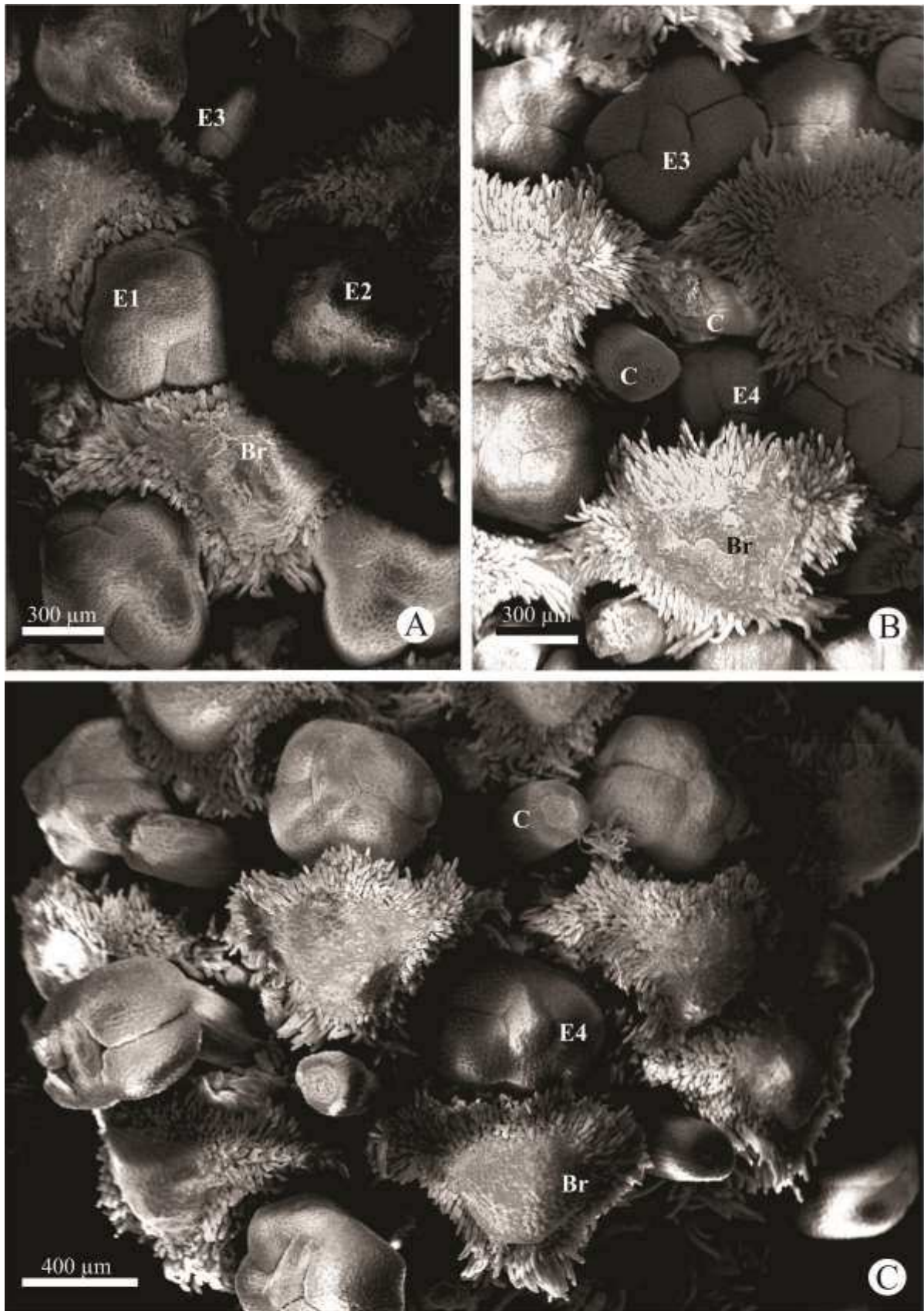


Figura 3. Flores estaminadas de *Piper caldense*. **A.** flor com estames 1 e 2 mais expostos e semelhante em altura que ao estame 3. **B.** flor com estame 3 exposto e a bractéola retraída expondo parcialmente o estame 4; observa-se as zonas de abscisão dos estames 1 e 2. **C.** bractéola completamente retraída expondo totalmente o estame 4; observa-se a cicatriz dos estames 1, 2 e 3. **Br** bractéola, **C** cicatriz, **E1** estame 1, **E2** estame 2, **E3** estame 3, **E4** estame 4.

O processo de abertura das flores hermafroditas e sua antese dura de oito a 12 dias. Esse processo apresenta diversas semelhanças com o das flores estaminadas, razão pela qual serão destacadas apenas as diferenças. Foi dividido nas seguintes fases:

Fase 1: flor hermafrodita em botão. É semelhante à fase 1 da flor estaminada, exceto pela presença do pistilo funcional. Com a retração da bractéola, os estigmas tornam-se visíveis, porém ainda estão justapostos (Figura 4A). Além disso, a antera do estame 4 já está parcialmente exposta (Figura 4A). A flor pode permanecer nesse estágio por até três dias.

Fase 2: fase pistilada. A flor permanece como mostrado na Figura 4A, entretanto os estigmas começam a se afastar e expõem as papilas da porção distal. A bractéola está completamente retraída e as anteras permanecem indeiscentes. A receptividade estigmática (exposição de papilas túrgidas) em período anterior ao da liberação de pólen caracteriza a dicogamia protogínica. Essa fase durou, em média, dois dias.

Fase 3: primeiro dia da fase bissexuada. Os estigmas estão mais afastados entre si, expondo quase totalmente as papilas estigmáticas. Inicia a atividade do androceu (liberação de pólen pelo estame 1 ou 2), caracterizando a protoginia incompleta e uma fase bissexuada da flor. A dinâmica de liberação de pólen é semelhante à da flor estaminada (Figura 4B).

Fase 4: segundo dia da fase bissexuada. Ocorre a liberação de pólen pelo segundo estame (estame 1 ou 2) e algumas flores apresentam o ápice dos estigmas escurecidos com papilas plasmolisadas, indicando o início da senescência celular das papilas estigmáticas. A viabilidade polínica média do estame 1 foi de $96,9\% \pm 1,2$ e do estame 2, $97,4\% \pm 1,8$.

Fase 5: terceiro dia da fase bissexuada (Figura 4C). O estame 3 libera pólen, com viabilidade média de $97,0\% \pm 1,7$. Os estigmas estão totalmente afastados entre si e a partir dessa fase é bastante variável a porção da superfície estigmática que apresenta escurecimento (Figura 4D).

Fase 6: quarto dia da fase bissexuada (Figura 4E). O estame 4 libera pólen, com viabilidade média de $97,2\% \pm 2,0$. A maioria das flores apresenta os estigmas completamente escurecidos com as papilas colapsadas, indicando o fim da

receptividade estigmática (Figura 4F); mas algumas flores podem apresentar papilas túrgidas e receptivas no terço basal dos estigmas. Após esse estágio ocorre o aumento do tamanho do ovário devido à formação do fruto.

Os valores médios de viabilidade polínica foram semelhantes e não houve diferença tanto entre os quatro estames das flores estaminadas e hermafroditas, quanto entre os morfos florais ($F = 0,453$, $p = 0,861$).

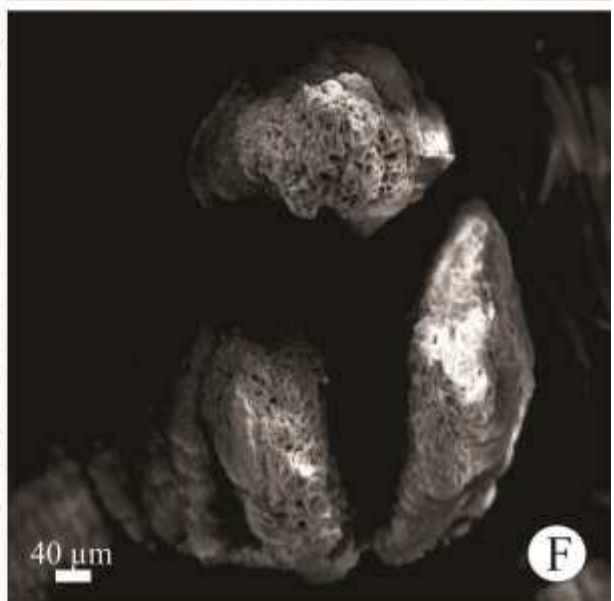
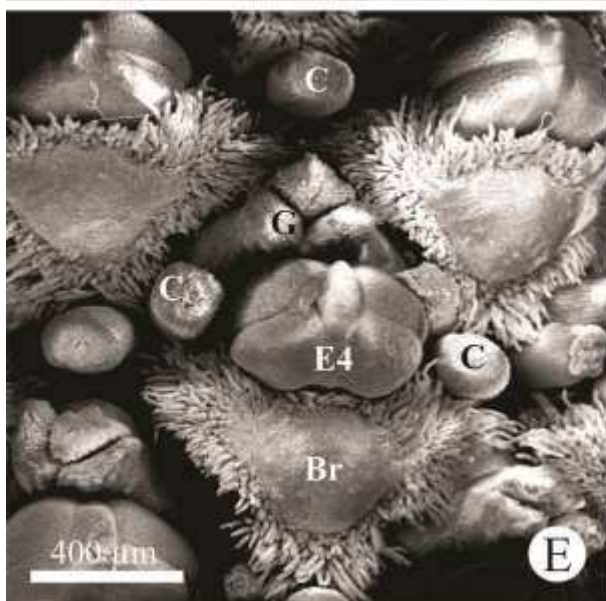
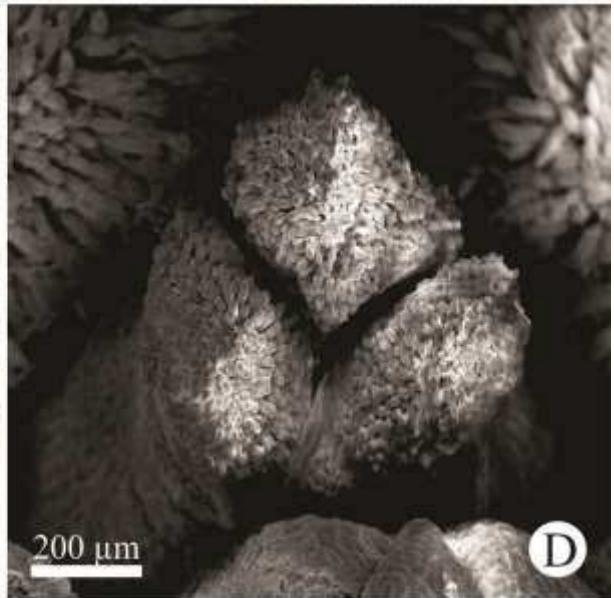
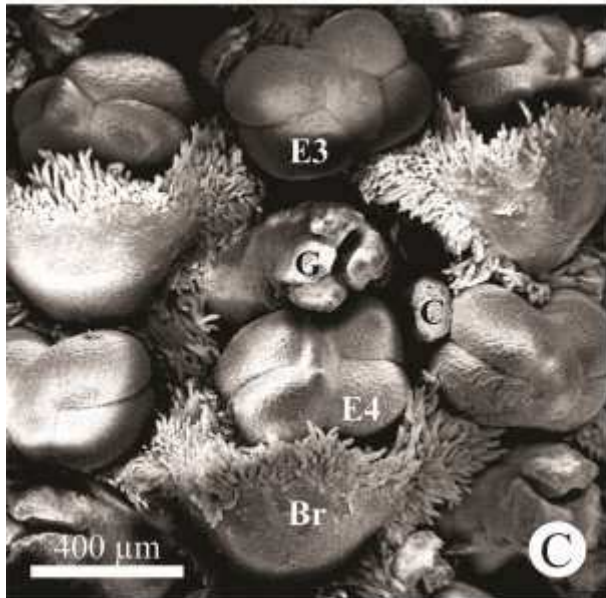
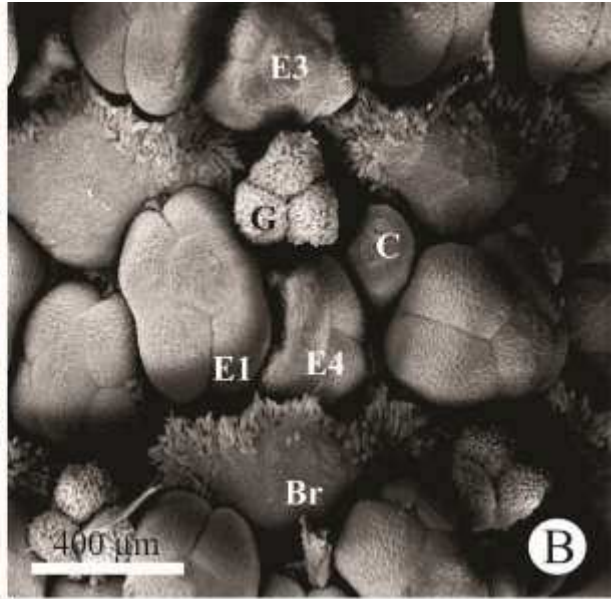
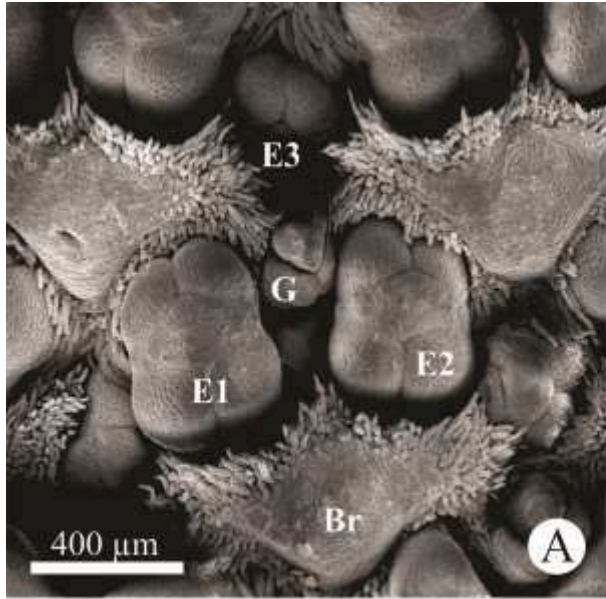


Figura 4. Flores hermafroditas de *Piper caldense*. **A.** Flor com estames 1 e 2 indeiscentes, o gineceu e estame 3 começam a tornar-se visíveis. **B.** Flor com estigmas mais afastados entre si expondo as papilas estigmáticas; observa-se a cicatriz do estame 2 e inicia a atividade de liberação de pólen pelo estame 1 ou 2. **C.** Flor com papilas estigmáticas receptivas na porção apical, observa-se as zonas de abscisão dos estames 1 e 2 e o estame 3 próximo a liberar pólen, bractéola afastando-se para exibir o estame 4. **D.** Detalhe dos estigmas totalmente afastados entre si com a porção da superfície estigmática não receptiva. **E.** Flores com papilas estigmáticas colapsadas no ápice e parte ventral; observa-se a cicatriz dos estames 1, 2 e 3, enquanto o estame 4 está próximo à liberação de pólen. **F.** Estigmas completamente escurecidos com as papilas estigmáticas plasmolisadas indicando a senescência do estigma. **Br** bractéola, **C** cicatriz, **E1** estame 1, **E2** estame 2, **E3** estame 3, **E4** estame 4.

3.2. Expressão sexual

Dos 50 indivíduos analisados, 15 abortaram todas as espigas ainda com flores em botão. Entre os restantes, 14 indivíduos tinham espigas com flores estaminadas e espigas com flores hermafroditas, o que caracteriza a andromonoiccia. Além desses, outros 21 indivíduos apresentaram somente espigas com flores estaminadas. Foram observadas diferenças nas dimensões entre espigas com flores hermafroditas e com flores estaminadas (Tabela 1). Houve diferença significativa tanto no comprimento ($F= 16,66$, $p = 3,6 e^{-6}$) das espigas quanto no diâmetro ($F = 33,22$, $p = 1,18 e^{-9}$).

Tabela 1. Médias das dimensões das espigas com flores hermafroditas e estaminadas de *Piper caldense*. Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente.

| Indivíduo | Espiga | Comprimento (mm) | Diâmetro (mm) |
|--------------|--------------|---------------------|------------------|
| Andromonoico | Hermafrodita | 36,3 ± 4,8a | 4,6 ± 0,5 a |
| | Estaminada | 30,5 ± 4,3b | 3,6 ± 0,4b |
| Masculino | Estaminada | 27,5 ± 4,2b | 3,5 ± 0,3b |

3.3. Sistema reprodutivo

Os resultados dos testes de polinização mostraram que *P. caldense* é autoincompatível e dependente de polinizadores para frutificar (Tabela 2). A menor quantidade de frutos/espiga (média de 161,5) em relação à quantidade de flores/espiga (média de 252,8) indica que nem todas as flores foram polinizadas e/ou fecundadas.

Tabela 2. Resultados dos testes de polinização para análise do sistema reprodutivo de *Piper caldense*. Para o cálculo da frutificação foram consideradas, em média, 252,8 flores por espiga.

| Tratamento | Indivíduos | Espigas | Frutos por espiga | |
|-------------------------------|------------|---------|-------------------|-------------|
| | | | Nº | % |
| Autopolinização espontânea | 15 | 15 | 0 | 0 |
| Polinização aberta (controle) | 15 | 15 | 161,5 ± 93,1 | 63,3 ± 36,2 |

3.3. Visitantes florais

As espigas foram visitadas por insetos pertencentes a duas ordens, cada uma com uma família: Hymenoptera, Apidae (abelhas) e Diptera, Syrphidae (moscas) (Tabela 3). Esses insetos retiravam pólen das espigas.

Entre as abelhas, foram observadas oito espécies agrupadas em seis gêneros (Tabela 3). Esses insetos realizaram um total de 349 visitas às flores. *Apis mellifera* apresentou a maior frequência de visitas, seguida por *Melipona quadrifasciata*, *M. bicolor*, *Trigona spinipes*, *M. mondury* e *Swarziana quatripunctata* (Figura 5); essas abelhas, em conjunto, realizaram 95,1% das visitas (Tabela 3).

Entre as moscas, foram observadas sete espécies agrupadas em quatro gêneros (Tabela 3). Esses insetos realizaram um total de 67 visitas às flores. A maior frequência de visitas foi de três espécies de *Ocyptamus*; essas moscas, em conjunto, realizaram 91,1% das visitas (Tabela 3).

Tabela 3. Insetos visitantes e número e porcentagem de visitas por inseto em flores de *Piper caldense* na Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

| Ordem/ Família/ Espécies | Número de visitas | Porcentagem |
|---|-------------------|-------------|
| Hymenoptera/ Apidae | | |
| <i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758 | 127 | 36,39 |
| <i>Melipona quadrifasciata</i> Lepeletier, 1836 | 50 | 14,33 |

| | | |
|---|------------|------------|
| <i>Melipona bicolor</i> Lepeletier, 1836 | 45 | 12,89 |
| <i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793) | 40 | 11,46 |
| <i>Melipona mondury</i> Smith, 1863 | 36 | 10,32 |
| <i>Schwarziana quadripunctata</i> Lepeletier, 1836 | 34 | 9,74 |
| <i>Tetragona elongata</i> (Lepeletier & Serville, 1828) | 9 | 2,58 |
| <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1825) | 8 | 2,29 |
| Total | 349 | 100 |
| Diptera/ Syrphidae | | |
| <i>Ocyptamus</i> sp.1 | 43 | 64,18 |
| <i>Ocyptamus</i> sp.2 | 11 | 16,42 |
| <i>Ocyptamus</i> sp.3 | 7 | 10,45 |
| <i>Salpingogaster</i> sp.1 | 2 | 2,99 |
| <i>Toxomerus</i> sp.1 | 2 | 2,99 |
| <i>Ocyptamus</i> sp.4 | 1 | 1,49 |
| <i>Argentinomyia</i> sp.1 | 1 | 1,49 |
| Total | 67 | 100 |



Figura 5. Himenópteros visitantes das espigas de *Piper caldense*, na Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A. *Melipona mondury*, espécie vibradora pousada sobre a espiga. B. *Schwarziana quadripunctata*, espécie não vibradora pousada sobre a espiga.

As abelhas iniciaram as visitas por volta das 8 h, que se prolongaram até as 16 h. Foi observado um pico de visitação entre 9 e 12 h e um pico menor às 15 h (Figura 6). Os horários e os picos de visitação das moscas foram semelhantes aos das abelhas, diferindo apenas em relação ao número de visitas (Figura 7).

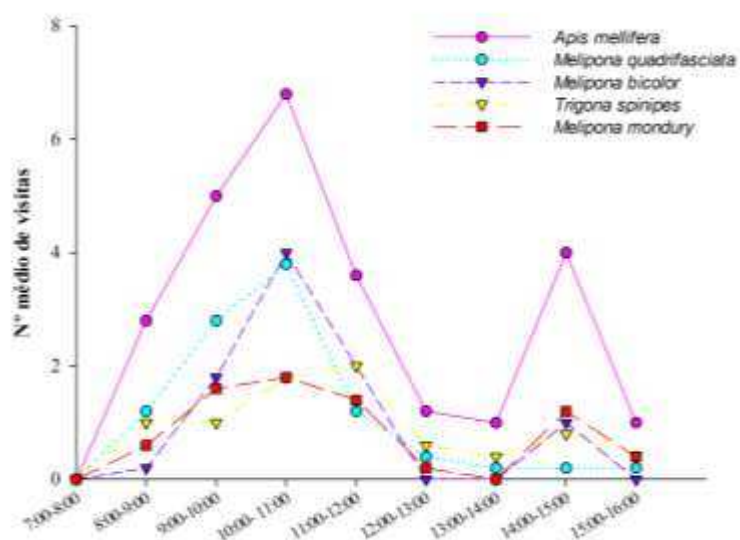


Figura 6. Número médio de visitas dos himenópteros em *Piper caldense* na Mata do Paraíso.

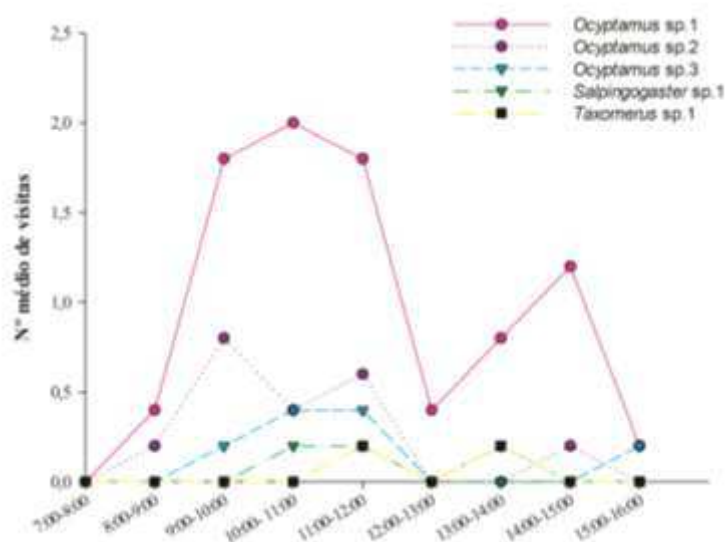


Figura 7. Número médio de visitas dos dípteros em *Piper caldense* na Mata do Paraíso.

As abelhas apresentaram comportamentos de visita distintos. Os indivíduos de *Melipona quadrifasciata*, *M. bicolor*, *M. mondury* pousavam sobre a espiga e vibravam as anteras das flores em antese para remover o pólen. As demais abelhas pousavam sobre a espiga sem vibrar e com o auxílio das peças bucais e pernas, retiravam o pólen das anteras, e às vezes caminhavam sobre as flores para acessar outras flores. Posteriormente, as abelhas realizavam a limpeza do corpo na região ventral e nas patas, transferindo o recurso coletado para as corbículas. Ao final da coleta, as corbículas apresentavam-se repletas de pólen, com formato de esferas de cor branca. Esses insetos visitaram três a cinco inflorescências por planta. As visitas duraram até 10 segundos por espiga.

O comportamento de visita das moscas foi similar entre si, visitando várias flores por espiga e permaneceram por cerca de 20 a 35 segundos em cada inflorescência. Durante essas visitas, os sirfídeos voaram de frente às espigas antes de abordá-las. Ao pousar, os dípteros caminham sobre a inflorescência e simultaneamente realiza movimentos abdominais para cima e para baixo contatando a espiga com o abdômen, onde posteriormente foi observado o pólen. Após a coleta, os dípteros faziam rápidos movimentos de limpeza do corpo. Os sirfídeos *Toxomerus* sp.1 e *Argentinomyia* sp.1 foram vistos ocasionalmente coletando pólen.

O comportamento de visita, os horários das visitas e os locais de deposição dos grãos de pólen nos corpos dos insetos indicam que os dois grupos de visitantes florais, em especial as abelhas, são polinizadores efetivos de *P. caldense*.

4. DISCUSSÃO

A morfologia floral de *P. caldense* é semelhante à de outras espécies de *Piper* neotropicais (Yuncker, 1972; 1973; Tebbs, 1993). A presença de flores hermafroditas é considerada basal na família (Tebbs, 1993) e é uma das características que define o clado das espécies neotropicais de Piperaceae (Jaramillo *et al.*, 2008). No entanto, *P. caldense* apresentou dois tipos de espigas, cada uma com um morfo floral, hermafrodita ou estaminado. Nesse caso, as espigas com flores estaminadas devem ampliar a função masculina (doação de

pólen) em relação à feminina (produção de semente). Adicionalmente, também pode estar relacionada à atração de polinizadores, tal como é sugerido por Miller & Diggle (2003), visto que o pólen é o único recurso floral.

Espigas com flores hermafroditas e com flores estaminadas num mesmo indivíduo caracteriza a andromonoícia *sensu* Richards (1997). Essa expressão sexual foi observada em outras duas espécies neotropicais de *Piper* (Figueiredo & Sazima, 2000; Silva, 2013). Entretanto, a presença de indivíduos que produzem apenas espigas com flores estaminadas, além dos andromonoicos, é aqui registrada pela primeira vez no gênero. Inexiste uma expressão que defina essa combinação entre indivíduos andromonoicos, que é uma expressão monomórfica (observado em um indivíduo), e indivíduos masculinos. De acordo com a terminologia de Sakai & Weller (1999), a população de *P. caldense* é dimórfica, pois possui indivíduos com dois morfos sexuais.

A protoginia incompleta, como observado em *P. caldense*, também foi descrita para outras espécies do gênero (Figueiredo & Sazima, 2000; Silva, 2013). A separação temporal das funções dos verticilos reprodutivos é considerada uma estratégia que favorece a polinização cruzada (Lloyd & Webb, 1986; Richard, 1997; Barrett, 2003). Não obstante, a protoginia incompleta não evita a autopolinização, por causa da fase bissexuada da flor. Nesse caso, a autoincompatibilidade, tal como verificada, é uma estratégia associada à dicogamia parcial que evita a autopolinização. Figueiredo & Sazima (2000) observaram essa combinação, protoginia incompleta e autoincompatibilidade, em seis espécies do sudeste brasileiro. Fleming (1985) sugeriu que as espécies neotropicais de *Piper* restritas ao interior de florestas úmidas são autocompatíveis, compensando menor número de visitantes. O nosso resultado é contrário à sugestão desse autor, demonstrando alternativas reprodutivas entre essas plantas.

Estigmas longevos (pelo menos quatro dias) parecem favorecer a protoginia incompleta, semelhante ao observado em *P. vicosanum* por Silva (2013). Outra semelhança com essa espécie e a aqui estudada é a exposição e a senescência das papilas estigmáticas de forma gradual e sequencial, em sentido basípeto. Silva (2013) foi pioneiro nessas observações e comentou que outros estudos com análises micro-morfológicas, que são raramente realizados, trariam

informações semelhantes às citadas anteriormente. Nossos resultados confirmaram as suposições desse autor.

A sequência assíncrona de liberação do pólen em *P. caldense* foi característica também descrita por Silva (2013) em *P. vicosanum*. A liberação de pólen por cada estame em diferentes épocas deve ser vantajosa para a espécie, pois fica ampliado o período de oferta desse recurso na flor, ampliando também as chances de polinização cruzada.

Os atributos da biologia floral somados à frequência e horário de visitas dos insetos mostraram que *P. caldense* é entomófila, assim como é a maioria das espécies de *Piper* (Martin & Gregory, 1962; Semple, 1974; Fleming, 1985; Figueiredo & Sazima, 2000; Thomazini & Thomazini, 2002; Kikuchi *et al.*, 2007). Ocorreu a sobreposição entre o horário predominante de liberação de pólen pelas flores e os horários de maior visitação das abelhas e dos dípteros. Essa sobreposição parece favorecer a espécie estudada, considerando que ela é autoincompatível e, portanto, depende de polinizadores. Os dados sobre a riqueza de espécies de insetos e o seu comportamento de visita reafirmam que os himenópteros foram os principais polinizadores de *P. caldense*.

Apis mellifera e *Melipona quadrifasciata*, as abelhas mais frequentes observadas nas espigas, são sociais e poliléticas e, por isso, exploram recursos florais de diversas espécies vegetais (Minussi & Alves-Santos, 2007; Nogueira & Augusto, 2007), incluindo o da espécie estudada. A ocorrência de *P. caldense* em áreas abertas, como bordas de mata, onde a incidência lumínica é maior (Thies *et al.*, 1998), pode ter favorecido a visitação desses insetos, observados comumente nessas condições.

A menor frequência de visita dos sirfídeos indica que são polinizadores secundários. Essas moscas comumente se alimentam de pólen (Gilbert, 1981) e a floração de *P. caldense* em época de menor disponibilidade desse recurso (estação seca) pode ter favorecido a presença desses insetos em suas flores. De fato, a atividade dos insetos em flores está mais relacionada à disponibilidade dos recursos florais, que pode ser afetada pelas condições ambientais (Gilbert, 1981).

Além da entomofilia, há relatos de anemofilia e de ambofilia em espécies de *Piper* (Martin & Gregory, 1962; Figueiredo & Sazima, 2000). Entretanto,

inexistem estudos detalhados que comprovem a polinização abiótica nessas plantas. Em *P. caldense*, a anemofilia foi descartada pelos seguintes motivos: 1) há visitação abundante de insetos, com comportamento de visita que favorece a polinização cruzada; 2) a permanência dos grãos de pólen sobre as anteras, de um dia para o outro, mostrando que o vento não atua como agente dispersor de pólen.

5. CONCLUSÕES

- *Piper caldense* possui dois morfos florais: estaminado e hermafrodita;
- Cada morfo encontra-se em espigas distintas: as espigas são observadas num mesmo indivíduo, caracterizando a andromonoiccia, ou o indivíduo possui apenas espigas estaminadas, característica inédita entre espécies de *Piper*;
- As espigas com flores hermafroditas apresentam, em média, mais flores do que as com flores estaminadas;
- A antese das espigas com flores estaminadas antecede a antese das espigas com flores hermafroditas;
- Há protoginia incompleta e a exposição e senescência das papilas estigmáticas ocorre de forma gradual e sequencial, em sentido basípeto;
- A fase bissexuada da flor inicia-se com a liberação de pólen, que ocorre na sequência 1, 1, 1 e 1 (um estame por vez), em quatro dias consecutivos, tanto nas espigas com flores estaminadas quanto nas com flores hermafroditas;
- Há autoincompatibilidade e, portanto, dependência por polinizadores para que ocorra a frutificação;
- Os polinizadores são, principalmente, abelhas sociais, que coletam pólen, o único recurso oferecido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrett, S. C. H. 2003. Mating strategies in flowering plants: the out-crossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 358: 991-1004.
- Carvalho-Okano, R. M. & Alves, S. A. M. 1998. Piperaceae C. Agardh da Estação Experimental Mata do Paraíso, Viçosa, MG. *Acta Botanica Brasilica* 12: 497-513.
- Dafni, A., Kevan, P. G. & Husbands, B. C. 2005. *Practical pollination biology*. Enviroquest Ltd. Cambridge.
- Drummond, G. M., Martins, C. S., Machado, A. B. M., Sebaio, F. A. & Antonini, Y. 2005. *Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação*. 2 ed. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Figueiredo, R. A. 1997. *Fenologia e ecologia da polinização de espécies de Piperaceae em mata semidecídua do sudeste brasileiro*. Campinas, Brasil [tese de doutorado]: Universidade Estadual de Campinas.
- Figueiredo, R. A. & Sazima, M. 2000. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany* 85: 455-460.
- Fleming, T. H. 1985. Coexistence of five sympatric *Piper* (Piperaceae) species in a tropical dry forest. *Ecology* 66: 688-700.
- Gilbert, F. S. 1981. Flower visiting by hoverflies (Syrphidae). *Journal biological Education* 14: 70-74.
- Guimarães E. F., Carvalho-Silva, M., Monteiro, D. & Medeiros, E. S. Piperaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB190>>. Acesso em: 25 mar 2014.

- Jaramillo, M. & Manos, P. 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 Intro psbj-petA. *Systematic Botany* 33: 647-660.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw Hill Book, New York.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Kearns, C. A. & Inouye, D. 1993. *Techniques for pollinations biologists*. Niwot, University Press of Colorado, Colorado.
- 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. & Webb, C. J. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 135-162.
- Marquis, R. J. 1988. Phenological variation in the neotropical understory shrub *Piper arieianum*: causes and consequences. *Ecology* 69: 1552-1565.
- 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.
- Menon, K. K. 1949. The survey of *pollu* and root diseases of pepper. *The Indian Journal of Agricultural Science* 19: 89-136.
- Miller, J. S. & Diggle, P. K. 2003. Diversification of andromonoecy in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae): the roles of phenotypic plasticity and architecture. *American Journal of Botany* 90: 707-715.

- Minussi, L. C. & Alves-Santos, I. 2007. Abelhas nativas versus *Apis mellifera* Linnaeus, espécie exótica (Hymenoptera: Apidae). *Bioscience Journal* 23: 58-62.
- 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.
- O'Brien, T. P., Feder, N. & McCully, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Oliveira-Filho, A. T. & Fontes, M. A. L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Prakash, N., Brown, J. F. & Yue-Hua, W. 1994. An embryological study of Kava, *Piper methysticum*. *Australian Journal of Botany* 42: 231-237.
- Quijano-Abril, M. A., Callejas-Posada, R. & Miranda-Esquivel, D. F. 2006. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography* 33: 1266-1278.
- R Development Core Team. 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>.
- Radford, A. E., Dickison, W. C., Massey, J. R. & Bell, C. R. 1974. Vascular plant systematics. Harper and Row, New York.
- Richards A. J. 1997. Plant breeding systems. 2nd edn. Chapman and Hall, London.
- Rosa, S. M. & Souza, L. A. 2004. Estruturas de reprodução de *Piper amalago* var. *medium* Linnaeus (Piperaceae). *Acta Científica Venezolana* 55: 27-34.

- Sakai, A. K. & Weller, S. G. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. In: Gender and sexual dimorphism in flowering plants. M. A. Geber, T. E. Dawson and L. F. Delph (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-31.
- Semple, K. S. 1974. Pollination in Piperaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 868-871.
- Silva, A. V. 2013. Fenologia de *Piper gaudichaudianum* Kunth e *P. vicosanum* Yunck. (Piperaceae) em fragmento de Floresta Atlântica, com enfoque na biologia floral de *P. vicosanum*. Viçosa, Brasil [dissertação de mestrado]: Universidade Federal de Viçosa.
- Tebbs, M. C. 1993. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World. 3. The taxonomy of *Piper* sections *Lepianthes* and *Radula*. *Bulletin of the Natural History Museum, Botany series* 23:1-50.
- Thies, W., Kalko, E. K. V. & Schinitzler, H. U. 1998. The roles of echolocation and olfaction in two neotropical fruit-eating bats, *Carollia perspicillata* and *C. castanea*, feeding on *Piper*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42: 397-409.
- Thomazini, M. J. & Thomazini, A. P. B. W. 2002. Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em inflorescências de *Piper hispidinervum* (C.D.C.). *Neotropical Entomology* 31: 27-34.
- 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.
- Wanke, S., Jaramillo, M. A., Borsch, T., Samain, M., 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: 477-497.

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; *Sarcorhachis*. Hoehnea 3: 29-284.