



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

**Diversidade morfológica e molecular em *Piper* (Piperaceae) em
um fragmento de Floresta Atlântica**

JHENIFFER ABELDT CHRIST

ALEGRE, ES

2016

JHENIFFER ABELDT CHRIST

**Diversidade morfológica e molecular em *Piper* (Piperaceae) em
um fragmento de Floresta Atlântica**

Dissertação Apresentada a Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento.

Orientadora: Dra. Tatiana Tavares Carrijo

Coorientadora: Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira

ALEGRE, ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C554d Christ, Jheniffer Abeldt, 1991-
Diversidade morfológica e molecular em Piper (Piperaceae) em um
fragmento de Floresta Atlântica / Jheniffer Abeldt Christ. – 2016.
100 f. : il.

Orientador: Tatiana Tavares Carrijo.

Coorientadora: Marcia Flores da Silva Ferreira.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias.

1. Análise multivariada. 2. Morfologia. 3. Taxonomia.
4. Microssatélites (Genética). I. Carrijo, Tatiana Tavares. II. Ferreira,
Marcia Flores da Silva. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 575:631

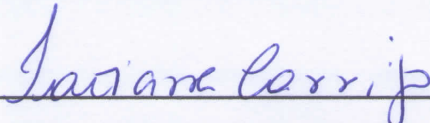
JHENIFFER ABELDT CHRIST

Diversidade morfológica e molecular em *Piper* (Piperaceae) em um fragmento de Floresta Atlântica

Dissertação Apresentada a Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 18 de Julho de 2016.

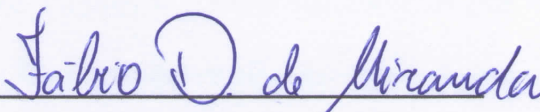
Comissão Examinadora:



Dra. Tatiana Tavares Carrijo

Universidade Federal do Espírito Santo


Orientadora



Dr. Fábio Demolinari de Miranda

Universidade Federal do Espírito Santo

Membro interno



Dra. Juliana Rosa P. M. de Oliveira

Universidade Federal do Espírito Santo

Membro externo



Dr. Mário Luís Garbin

Universidade Vila Velha

Membro externo

Dedico

Aos meus pais, Jorge José Christ e Ana Lúcia Abeldt Christ e aos meus avós Alozino Christ, Santinha Maria Erlacher Christ (*in memorian*), Waldemar Abeldt (*in memorian*) e Maura Pereira Abeldt

Ofereço

À minha orientadora Tatiana Tavares Carrijo

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo pelo apoio logístico no desenvolvimento desse projeto e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento;

À FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo) pela concessão da bolsa e pelo financiamento da pesquisa a qual esse trabalho está vinculado;

À minha orientadora Tatiana T. Carrijo por participar do meu crescimento profissional durante os últimos quatro anos e coorientadora Marcia Flores da Silva Ferreira pelo esforço para a construção deste trabalho;

Aos amigos do Laboratórios de Botânica - Filipe Torres, Renan Hollunder, Jaqueline Luber, Karlo Gregório, Amélia Tuler, Roberta Paschoa, Amanda Batista, Cecília Valente e Karina Ferreira - e Genética e Melhoramento Vegetal – Marina Santos, Carolina Bernardes, Liana Mengarda, Iana Quadros, Drielli Canal e Paula Mauri - por participarem no desenvolvimento desta pesquisa de maneira mais alegre e descontraída;

Aos amigos pessoais Cristiana Torres, Sabrina Torres, Milla Santos, Renan Morceli, Dalvan Ribeiro, Mário Santos, Rayssa Passamani e Carol Spindola por participarem dessa etapa da minha vida;

À minha família pelo apoio incondicional e meu namorado por acompanhar e apoiar todas as decisões.

Entregue seu caminho ao Senhor.

Confie Nele, e Ele agirá.

Salmos 37

Lista de Abreviaturas

°C - Graus Celsius

µL - microlitro

DNA - *desoxirribonucleico acid*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

Fig. - Figura

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

Min. - Minutos

ng - nanogramas

P. - *Piper*

PCR - Reações em Cadeia da Polimerase

SNPs - *Single Nucleotide Polymorphism*

SSR - *Simple Sequence Repeats*

UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages*

Lista de Figuras

Contextualização teórica

Figura 1. Distribuição pantropical das espécies de *Piper* L. no mundo (Stevens continuamente atualizado) 10

Capítulo 1

Figure 1. Location map of the study area. A - Brazil map highlighting the Espírito Santo state; B - Espírito Santo state highlighting the municipality of Castelo; C - Municipality of Castelo highlighting the studied area (MFSP) 56

Figure 2. A-C. *Piper aduncum* L. (J.A.Christ *et al.* 03) - A. branches with spike; B. detail of trichomes in secondary veins; C. detail of trichomes in branches. D-F. *Piper amalago* L. (T.T. Carrijo *et al.* 1722) - D. branches with spike; E. detail of trichomes in secondary veins; F. detail of trichomes in branches. G-H. *Piper anisum* (Spreng.) Angely. (T.T. Carrijo *et al.* 1693) - G. branches with spike; H. detail of pedicellate fruit. I-J. *Piper bicornis* M. Carvalho-Silva, E.F. Guim. & L.A. Pereira (T.T. Carrijo *et al.* 1632) – I. branches with spike; J. detail form leaf and veins form. K-L. *Piper bowiei* Yunck. (J.A.Christ *et al.* 12) - K. branches with spike; L. detail of stigma ligulate 57

Figure 3. A-B. *Piper caldense* C.DC. (T.T.Carrijo *et al.* 1645) – A. branches with spike; B. detail of veins abaxial face. C. *Piper dilatatum* Rich. (J.A. *et al.* Christ 01) – branches with spike. D. *Piper gaudichaudianum* Kunth. (T.T. Carrijo *et al.* 1612) - branches with spike. E. *Piper glabratum* Kunth (T.T. Carrijo *et al.* 1585) – branches with spike. F. *Piper hoffmannseggianum* Roem. & Schult. (T.T.Carrijo *et al.* 1543) – branches with spike. G-H. *Piper macedoi* Yunck. (T.T.Carrijo *et al.* 1586) – G. branches with spike; H. detail of trichomes in secondary veins 58

Figure 4. A-B. *Piper miquelianum* C.DC. (J.A.Christ *et al.* 16) - A. branches with spike; B. detail of trichomes in branches; F. detail of trichomes in veins. C. *Piper permucronatum* C.DC. (J.A.Christ *et al.* 7) - branches with spike. D-F. *Piper piliovarium* Yunck. (T.T.Carrijo *et al.* s.n.) – D. branches with spike; E. detail leaf whit base asymmetric; E. detail of trichomes petiole. G. *Piper pubisubmarginalum* Yunck. (T.T. *et al.* Carrijo 1688) – branches with spike. H. *Piper tuberculatum* Jacq. (T.T.Carrijo *et al.* 1666) – branches with spike; I. *Piper vicosanum* Yunck. (J.A.Christ *et al.* 17) – branches with spike 59

Capítulo 2

Figura 1. Heat map do perfil de amplificação dos 45 SSR por espécie: agrupamento de 16 espécies analisadas de género *Piper* (agrupamento vertical); agrupamento dos 46 marcadores originalmente desenvolvidos para *Piper solmsianum*, *P. cordulatum*, *P. nigrum* e *P. polysyphonum* (agrupamento horizontal) transferíveis para pelo menos quatro espécies deste estudo (apêndice 1). Bandas vermelhas representam presença de amplificação, e verdes ausência de amplificação. adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernnum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*; miq: *P. miquelianum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum* 80

Figura 2. Grupos, indicados por colchetes, formados pela análise de agrupamento (UPGMA) com base na amplificação dos 45 primers SSR transferíveis para pelo menos uma espécie deste estudo (apêndice 1). A primeira linha indica a partição dos grupos considerando todas as espécies analisadas, e a segunda, a partição dentro dos grupos. adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernnum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*; miq: *P. miquelianum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum* 81

Figura 3. Árvore de regressão multivariada de caracteres moleculares de 16 espécies de *Piper*. Números representam primers (apêndice 1). As espécies são representadas por adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernnum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*; miq: *P. miquelianum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum*. Ramos à esquerda indicam ausência de perfis amplificação do primer, enquanto os ramos à direita indicam os perfis de ampliação dos primers. Esta figura demonstra que nove perfis de amplificação de primers são suficientes para identificar as 16 espécies de *Piper* estudadas 82

Figura 4. Grupos, indicados por colchetes, formados pela análise de agrupamento (UPGMA) com base em atributos morfológicos de *Piper* (apêndice 2). A primeira linha pontilhada indica a partição dos grupos considerando todas as espécies analisadas, e segunda linha, a partição dentro dos maiores grupos. adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bic: *P. bicornis*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernnum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*;

hof: *P. hoffmannseggianum*; mac: *P. macedoi*; miq: *P. miquelianum*; per: *P. permucronatum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum* 83

Figura 5. Heat map dos 66 estados de caractere morfológicos por espécie: agrupamento de 16 espécies analisadas de género *Piper* (agrupamento vertical); agrupamento dos 66 estados de caracteres morfológicos (agrupamento horizontal) (apêndice 3). Bandas vermelhas representam presença do caractere, e verdes ausência dos caracteres. adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bic: *P. bicornis*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernuum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*; hof: *P. hoffmannseggianum*; mac: *P. macedoi*; miq: *P. miquelianum*; per: *P. permucronatum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum* 84

Sumário

Contextualização teórica	10
Referências.....	17
Capítulo I: The genus <i>Piper</i> L. (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brazil	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introduction	25
Material and methods	27
<i>Study site and fieldwork</i>	27
<i>Taxonomic study</i>	27
Results and discussion.....	28
Key to the species of <i>Piper</i> from the Mata das Flores state park.....	28
References	52
Capítulo II: <i>Fingerprinting</i> baseado na transferibilidade de marcadores SSR para identificação de espécies de <i>Piper</i> L. (Piperaceae)	60
Resumo.....	61
Introdução.....	62
Material e métodos	65
<i>Obtenção e análise dos dados moleculares</i>	65
<i>Amostragem, obtenção e análise dos dados morfológicos</i>	67
Resultados.....	68
<i>Análise dos dados moleculares</i>	68
<i>Análise dos dados morfológicos</i>	69
Discussão	71
Conclusão.....	74
Referências.....	75
Apêndice 1. <i>Primers</i> desenvolvidos para <i>Piper solmsianum</i> , <i>P. Cordulatum</i> , <i>P. polysyphonum</i> e <i>P. nigrum</i> utilizados neste estudo	85
Apêndice 2. Caracteres morfológicos multicategóricos utilizados na análise de agrupamento (UPGMA) e teste de nitidez de grupos.....	88
Apêndice 3. Caracteres morfológicos binários utilizados para a construção do Heat map.....	91

Contextualização Teórica

Piperaceae é umas das maiores famílias de Angiospermas com cerca de 3.615 espécies distribuídas de forma pantropical (Fig. 1) (Stevens continuamente atualizado). Seus representantes são importantes elementos da composição do sub-bosque de florestas tropicais (Laska, 1997; Nepokroef *et al.*, 1999; Jaramillo & Manos 2001). Historicamente foram descritos cerca de 19 gêneros para a família Piperaceae. No entanto, atualmente são aceitos os gêneros *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Manekia* Trel., *Zippelia* Blume e *Verhuellia* Miq. (Stevens continuamente atualizado). Os representantes da família são facilmente reconhecidos por apresentarem folhas simples, flores diminutas, aclamídeas reunidas em inflorescências do tipo espiga, ovário súpero com um óvulo e fruto do tipo drupa (Yuncker, 1972). No entanto, a dificuldade de delimitação taxonômica em Piperaceae reside no nível específico.

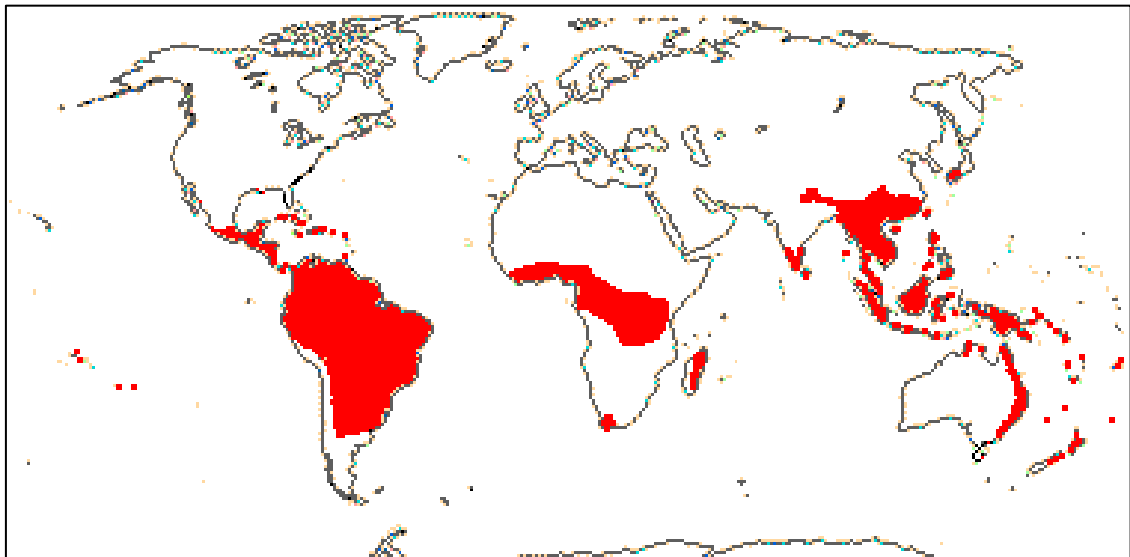


Figura 1. Distribuição pantropical das espécies de Piperaceae mundo (Stevens continuamente atualizado).

A primeira contribuição tratando especificamente de Piperaceae no Brasil foi a “Flora Fluminense” de Velloso em 1827, onde 12 espécies foram descritas e ilustradas, seguido da “Flora Brasiliensis” de Miquel (1852) que reuniu conhecimento sobre 169 espécies de Piperaceae. Posteriormente, De Candolle (1869) desenvolveu a obra “Prodromus”, a qual incluiu todas as espécies mundialmente conhecidas para a família. Durante 50 anos de estudo, Yuncker (1971, 1972, 1974) realizou uma vasta revisão das espécies de Piperaceae no Brasil apresentada em uma obra de quatro volumes. Este autor reuniu conhecimento sobre 457 espécies de Piperaceae, inclusive novos táxons para a ciência, e revisou nomes para os gêneros *Piper*, *Peperomia*, *Photomorphe*, *Sarcorrhachis* e *Ottonia*. Esta obra é reconhecida como a principal contribuição para o conhecimento de Piperaceae no Brasil, dado que nenhum estudo semelhante foi realizado a partir de então.

Atualmente, são reconhecidos para o Brasil os gêneros *Peperomia* Ruiz & Pav., *Manekia* Trel., *Piper* L. e *Ottonia* Spreng., sendo que os dois últimos seguem em processo de sinonimização (BFG 2015). Das 458 espécies que ocorrem do país, 330 são endêmicas ocorrendo em todos os biomas, principalmente na Floresta Atlântica (BFG, 2015). A região sudeste é apontada como a região com maior representação de táxons de Piperaceae (260 ssp.), seguida pela região Norte (239 ssp.), Nordeste (146 ssp.), Sul (132 ssp.) e Centro-Oeste (112 ssp.) (BFG, 2015). A composição florística de Piperaceae nos estados é conhecida por levantamentos florísticos de Angiospermas e floras locais (v. Melo *et al.*, 2013; Kozera *et al.*, 2009; Monteiro, 2013; Bardelli *et al.*, 2008; Monteiro & Guimarães, 2009; Sarnaglia Junior, 2014) e estão sumarizados na Lista de espécies da Flora do Brasil (BFG, 2015). Os únicos estados que apresentam monografias específicas para Piperaceae são Santa Catarina (Guimarães & Valente, 2001) e São Paulo (Guimarães & Carvalho-Silva, 2009). No Espírito Santo são registradas 129 espécies de Piperaceae (BFG, 2015). No entanto, poucos estudos foram realizados voltados para o levantamento sistemático da família.

Muitos representantes da família Piperaceae são conhecidos devido às suas propriedades medicinais e alimentares, principalmente no gênero *Piper*. *Piper nigrum* L. (pimenta do reino) é a espécie mais conhecida da família dada a sua importância econômica em todo mundo. Suas sementes são comercializadas como uma especiaria desde o século XVII, destacando-se ainda pela grande influência nos eventos históricos do mundo (Medeiros & Guimarães, 2007; EMBRAPA, 2016). No Brasil, as espécies de *Piper* se destacam pelo uso medicinal em comunidades tradicionais, como *Piper callosum* Ruiz & Pav., *P. divaricatum* G.Mey., *P. nigrum* L., *P. umbellatum* L., *P. methysticum* Forster e *P. aduncum* L., sendo comumente citadas em estudos etnobotânicos (Guimarães & Giordano 2004; Hoeffel *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2004; Sudmoon *et al.*, 2012). As propriedades medicinais das espécies de *Piper*, descoberta por estudos etnobotânicos, têm impulsionado pesquisas orientadas ao efeito mutagênico e inseticida (Silva *et al.*, 2007; Zacaroni *et al.*, 2009; Souza-Filho *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2013; Regasini *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009). Além do potencial econômico, as espécies de *Piper* também apresentam destacado papel ecológico.

A polinização neste gênero é comumente realizada por abelhas e outros insetos, os quais demonstram uma relação mutualística com várias espécies (Yamamoto *et al.*, 2007). As sementes de *Piper* são frequentemente dispersas por aves e morcegos atraídos pelo odor dos frutos (Mikich, 2002, Raia *et al.*, 2009). A dispersão de sementes pelas fezes de morcegos auxilia no processo de regeneração das áreas degradadas provocando uma chuva de sementes (Mikich & Bianconi, 2005), uma vez que os morcegos forrageiam por longas distâncias. Além disso, as espécies do gênero são importantes componentes na composição do sub-bosque de florestas tropicais (Laska *et al.*, 1997), principalmente em representatividade. Apesar disso, pouco se sabe sobre a utilização de *Piper* em programas ecológicos.

Piper é o maior gênero da família Piperaceae reunindo cerca de 2.000 espécies no mundo (Stevens continuamente atualizado). Filogenias recentes indicam que o gênero é monofilético, e dão suporte para três clados principais, incluindo espécies do Neotrópico, da Ásia e do Pacífico Sul (Jaramillo & Manos 2001; Jaramillo *et al.*, 2008) revelando que espécies mais relacionadas apresentam o mesmo padrão de distribuição no globo. No Brasil, ocorrem 289 espécies sendo que 178 são endêmicas do país (BFG, 2015). O principal caractere utilizado distinguir *Piper* dos demais gêneros da família é o hábito arbóreo-arbustivo, já que *Peperomia* agrupa as espécies herbáceas (Souza & Lorenzi, 2012), enquanto *Manekia* compreende as trepadeiras volúveis (Schubert *et al.*, 2012). A morfologia das folhas, das nervuras e das brácteas florais são os caracteres morfológicos tradicionalmente empregados para circunscrever as espécies de *Piper*. No entanto, o tamanho das flores e a variação na forma dos caracteres vegetativos, associados à elevada riqueza de táxons do gênero, podem dificultar a delimitação das espécies (Jaramillo & Manos, 2001; Yuncker, 1972; Guimarães & Carvalho-Silva, 2009; Carvalho-Silva *et al.*, 2015).

Ferramentas que possam auxiliar a delimitação de espécies vêm sendo desenvolvidas no âmbito da taxonomia de grandes grupos, como a caracterização polínica (Alves-Araújo, 2007; Carrijo *et al.*, 2013; Mourelle *et al.*, 2015), anatômica (Gogosz *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2015) e citogenética (Nunes *et al.*, 2007; Felix & Guerra, 2000; Guerra, 2008). Os marcadores moleculares são tradicionalmente utilizados em estudos de plantas desde 1960. Isso permitiu desenvolver pesquisas voltadas para o entendimento da estrutura de populações, fluxo gênico e sistemas de acasalamento através da codificação de alelos de genes no mesmo locus (Nybom *et al.*, 2014). Tradicionalmente, estudos taxonômicos são realizados principalmente através das características morfológicas, mas estes apresentam limitações como a subjetividade nos dados e plasticidade devido à variação ambiental. Neste sentido, estudos utilizando marcadores moleculares vêm sendo desenvolvidos

comparando espécies semelhantes morfológicamente (Anand *et al.*, 2010; Chae *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015), visando melhor entendimento dos limites entre táxons.

Dentre as técnicas utilizadas, o DNA *fingerprinting* visa a delimitação de táxons utilizando marcadores moleculares a partir de estimativas de diversidade genética, distâncias genéticas e detecção de alelos exclusivos (Nybom *et al.*, 2014). A técnica permite a neutralidade e objetividade em detrimento ao uso da morfologia, uma vez que os caracteres utilizados não são dúbios ou passíveis de interpretação, como a forma de órgãos reprodutivos ou vegetativos nas plantas. Os marcadores microssatélites (*Simple Sequence Repeats* -SSR) vêm se destacando como um dos mais importantes para métodos de DNA *fingerprinting*, identificação de parentesco, de mapeamento genético e conservação de espécies (Putman & Carbone, 2014). Os microssatélites são repetições curtas em tandem de 2 a 6 pares de base amplamente distribuídas por todo o genoma nuclear de eucariontes e procariontes (Kalia *et al.*, 2011). Estes marcadores apresentam alto nível de polimorfismo de alelos, evidenciando grande variabilidade entre genótipos, mesmo em organismos que apresentam pouca variação genética (Bhargava & Fontes, 2010). O alto custo e a metodologia laboriosa podem ser uma dificuldade para o desenvolvimento de *primers* microssatélites. No entanto, facilidade de uso devido à alta reprodutibilidade e abundância de microssatélites nos organismos torna esses marcadores ideais para análise de diversidade genética

Os microssatélites são altamente mutáveis ocasionando o surgimento de um novo alelo com inserções ou deleções de pares de base (Putman & Carbone, 2014). Por essa razão, a observação da variação alélica pode levar a dificuldades de interpretação de dados quando a busca reside em alelos exclusivos à determinada espécie. Uma outra situação que pode dificultar a determinação de alelos exclusivos é a limitação da amostragem. Os indivíduos selecionados para o estudo podem não ser suficientemente representativos para a estimativa precisa da frequência alélica da espécie como um todo. Visando contornar as principais dificuldades no uso de marcadores microssatélites para

identificação de plantas, Tuler *et al.* (2015) propõe a técnica *fingerprinting* de transferibilidade para auxiliar a identificação de táxons. O método é baseado na observação da amplificação de primers microssatélites submetidos à transferibilidade. As regiões que flanqueiam os microssatélites são altamente conservadas podendo ser observadas em táxons relacionados (Gupta & Varshney, 2000). A presença dessas regiões permite a observação de amplificação de *primers* microssatélites submetidos à transferibilidade. Os *primers* transferidos atestam a manutenção da região conservada em táxons relacionados. A utilização de caracteres conservados para a identificação das espécies pode auxiliar, igualmente, no processo de delimitação taxonômica das espécies.

Este estudo tem como ponto focal a diversidade morfológica e molecular de *Piper*. Inicialmente foi realizado um estudo florístico-taxonômico para conhecimento das espécies deste gênero ocorrentes em um trecho de Floresta Semidecidual e Ombrófila (Oliveira-Filho *et al.*, 2005), tipo de vegetação que geralmente apresenta elevada riqueza de espécies de *Piper*, localizado ao Sul do estado do Espírito Santo. O desenvolvimento deste trabalho foi motivado pelo fato deste fragmento nunca ter passado por um inventário sistemático de sua flora, e estar localizado em uma das áreas prioritárias para conservação da Floresta Atlântica no Espírito Santo. Apesar de ser protegida por uma Unidade de Conservação estadual, o fragmento estudado sofre impacto direto das áreas rural e urbana circunvizinhas, e a UC que o gerencia não possuía instrumentos (dados científicos) para a tomada de decisões em relação à conservação de suas espécies. Desta forma, este trabalho foi realizado no âmbito de um projeto maior, no qual outras famílias botânicas vêm sendo igualmente estudadas. Os dados deste trabalho são apresentados no “Capítulo I”. O levantamento realizado durante três anos de coletas intensivas resultou na identificação de 20 espécies de *Piper* que foram identificadas, descritas e ilustradas. O manuscrito referente a este capítulo foi submetido ao periódico Rodriguésia, e já se encontra aceito.

O segundo trabalho foi motivado pela dificuldade encontrada para identificação de algumas espécies durante o desenvolvimento do capítulo I. As espécies de *Piper* são de difícil identificação dado que são muito semelhantes morfológicamente a outras espécies, e os caracteres diagnósticos, presentes em flores e frutos, podem ser de difícil observação até mesmo para especialistas. Além disso, algumas espécies são diferenciadas por caracteres tênues, o que leva a dúvida em relação a existência de descontinuidades morfológicas suficientes para o estabelecimento de dois ou mais táxons distintos. A detecção destes problemas motivou a realização o segundo capítulo, no qual foi utilizado um marcador molecular para identificar e delimitar espécies de *Piper*. A técnica utilizada se baseia em um *fingerprinting* utilizando a transferibilidade de marcadores microssatélites. Os dados moleculares foram comparados e discutidos em conjunto aos dados morfológicos, objetivando o melhor entendimento das dificuldades taxonômicas detectadas no primeiro estudo. Estudos que possibilitem a identificação correta das espécies de *Piper*, contornando as principais dificuldades encontradas na taxonomia do gênero, podem auxiliar trabalhos de seleção de espécies potenciais para processo de pré-melhoramento genético.

Referências

- Alves-Araújo A, Santos FA & Alves M. 2007.** Caracterização palinológica de espécies de Amaryllidaceae sensu stricto ocorrentes no nordeste brasileiro. *Acta Bot Bras* **21**: 967–976.
- Anand KK, Srivastava RK, Chaudhary LB, et al. 2010.** Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabaceae) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. *Taiwania* **55**: 197–207.
- Andree K, Axtner J, Bagley MJ, Barlow EJ, et al. 2010.** Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 April 2010–31 May 2010. *Molecular ecology resources* **10**: 1098-1105.
- Bardelli KC, Kirizawa M & Sousa AVG de. 2008.** The genus *Piper* L.(Piperaceae) of microbasin of Sítio Cabuçu-Proguaru Atlantic Rain Forest of Guarulhos, SP, Brasil. *Hoehnea* **35**: 553–561.
- Bhargava A & Fuentes FF. 2010.** Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology* **44**: 250–266.
- Brazil Flora Group (BFG). 2015.** Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* **66**: 1085-1113.
- Carrijo TT, Garbin ML, Picanço Leite W, et al. 2013.** Pollen morphology of some related genera of Vernonieae (Asteraceae) and its taxonomic significance. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 1275–1283.
- Carvalho-Silva M, Guimarães EF, Pereira La, et al. 2015.** Two new species of *Piper* section *Ottonia* (Piperaceae) from southeastern Brazil. *Phytotaxa* **212**: 293–299.
- Chae WB, Hong SJ, Gifford JM, et al. 2014.** Plant morphology, genome size, and SSR markers differentiate five distinct taxonomic groups among accessions in the genus *Miscanthus*. *GCB Bioenergy* **6**: 646–660.
- De Candolle, C. 1869.** Piperaceae. In: De Candolle, A. (ed.). *Prodromus sistematicus naturalis regni vegetabilis* **16**:235-471.
- Embrapa 2016.** Disponível em <https://www.embrapa.br/>
- Félix LP & Guerra M. 2000.** Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of *Cymbidioid orchids*. *Genetics and Molecular Biology* **23**: 957–978.
- Gogosz AM, Boerger MRT, Negrelle RB, et al. 2012.** Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). *Rodriguésia* **63**.
- Guerra M. 2008.** Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research* **120**: 339–350.
- Guimarães EF & Carvalho-Silva M. 2009.** Uma nova espécie e novos nomes em *Piper*

seção *Ottonia* (Piperaceae) para o Sudeste do Brasil. *Hoehnea* **36**: 431–435.

Guimarães EF & Carvalho-Silva M. 2012. Piperaceae *In*: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. v. 7, São Paulo: Instituto de Botânica.

Guimarães EF & Giordano LCS. 2004. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. *Rodriguésia* **55**: 21-46.

Guimarães EF & Valente MC. 2001 Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí.

Gupta PK & Varshney RK. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* **113**: 163–185.

Hoeffel JLM, Gonçalves NM, Fadini AAB & Seixas SRC. 2011. Conhecimento tradicional e uso de plantas medicinais. *Revista Vitas*. **1**.

Jaramillo MA & Manos PS. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* **88**: 706–716.

Jaramillo MA, Callejas R, Davidson C, et al. 2008. A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron psbJ–petA. *Systematic Botany* **33**: 647–660.

Kalia RK, Rai MK, Kalia S, et al. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* **177**: 309–334.

Kozera C, Rodrigues RR & Dittrich V de O. 2009. Composição florística do sub-bosque de uma Floresta Ombrófila Densa Montana, Morretes, PR, Brasil. *Floresta* **39**: 323–334.

Laska MS. 1997. Structure of Understory Shrub Assemblages in Adjacent Secondary and Old Growth Tropical Wet Forests, Costa Rica. *Biotropica* **29**: 29–37.

Lima DF, Mauad AVS, da Silva-Pereira V, et al. 2015. Species boundaries inferred from ISSR markers in the *Myrcia laruotteana* complex (Myrtaceae). *Plant Systematics and Evolution* **301**: 353–363.

Lima RK, Cardoso MG, Moraes JC, et al. 2009. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). *Acta amazônica* **39**: 377–382.

Luna BN de, Carrijo TT, Freitas M de F, et al. 2013. Comparative leaf anatomy of neotropical *Stylogyne* species (Myrsinoideae-Primulaceae). *Rodriguésia* **64**: 717–726.

Machado NS de O, Pereira FG, Santos PRD dos, et al. 2015. Comparative anatomy of the leaves of *Piper lepturum* (Kunth) C.DC. var. *lepturum* and *Piper lepturum* var. *angustifolium* (C.DC.) Yunck. *Hoehnea* **42**: 01–08.

Medeiros EVSS & Guimarães EF. 2007. Piperaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica* **25**: 227.

Melo A, Araújo AA & Alves M. 2013. Flora of Usina São José, Igarassu, Pernambuco:

Aristolochiaceae and Piperaceae. *Rodriguésia* **64**: 543–553.

Mikich SB & Bianconi GV. 2005. Potencializando o papel dos morcegos frugívoros na recuperação de áreas degradadas. *Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo* **51**: 155–164.

Mikich SB. 2002. The diet of fruit-eating bats (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) in a small semideciduous seasonal forest remnant in south Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* **19**: 239–249.

Miquel FAW. 1852. Chloranthaceae et Piperaceae. In: C.F.P. Martius & A.G. Eichler (eds.). Flora brasiliensis, Lipsiae, *Frid. Fleischer* **4**: 1-76.

Monteiro D & Guimarães EF. 2009. Flora Do Parque Nacional Do Itatiaia – Brasil: *Manekia* e *Piper* (Piperaceae). Rio de Janeiro. *Rodriguésia* **60**: 999- 1024.

Monteiro D. 2013. Piperaceae in a fragment of atlantic forest of the Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brazil. *Rodriguésia* **64**: 379–398.

Mourelle D, Gaiero P, Speroni G, et al. 2016. Comparative pollen morphology and viability among endangered species of *Butia* (Arecaceae) and its implications for species delimitation and conservation. *Palynology* **40**: 160–171.

Nascimento FR, Cardoso MG, Souza PE, et al. 2008. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi Hyphomycetes). *Acta Amaz* **38**: 503–508.

Nepokroeff M, Bremer B & Sytsma KJ. 1999. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. *Systematic Botany* **24**: 5–27.

Nunes JD, Torres GA, Davide LC, et al. 2007. Cytogenetics of *Piper hispidinervum* and *Piper aduncum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**: 1049–1052.

Nybom H, Weising K & Rotter B. 2014. DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investigative genetics* **5**: 1.

Oliveira-Filho, AT, Tameirão-Neto E, Carvalho WAC et al., 2005. Análise florística do compartimento arbóreo de áreas de Floresta atlântica sensu lato na região das bacias do Leste (Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio De Janeiro). *Rodriguésia* **56**: 185–235.

Pereira RC, Oliveira MTR & Lemos GCS. 2004. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes-RJ. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **14**: 37–40.

Putman AI & Carbone I. 2014. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution*: n/a-n/a.

Raia RZ, Bechara FC, Fabiane KC, et al. 2009. Atração de morcegos frugívoros através de óleo essencial de *Piper aduncum* visando à restauração ecológica. *Seminário*

De Iniciação Científica e Tecnológica Da Ufpr 14.

Regasini LO, Cotinguiba F, Morandim A de A, et al. 2009. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. *African journal of Biotechnology* 8.

Rocha FB, Hanada RE, de Albuquerque ST, et al. 2013. *Pseudocercospora piperis* associated with leaf spots on *Piper aduncum* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 8: 101–103.

Santos MRA, Silva AG, Lima RA, et al. 2010. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). *Revista Brasileira de Botânica* 33: 319–324.

Sarnaglia Junior VB, Martins Bermudez GM & Guimarães EF. 2013. Diversidade de Piperaceae em um remanescente de Floresta Atlântica na região serrana do Espírito Santo, Brasil. *Biotemas* 27.

Schubert HK, Taylor MS, Smith JF, Bornstein AJ. 2012. A Systematic Revision of the Genus *Manekia* (Piperaceae). *Systematic Botany* 37: 587-598.

Schubert HK, Taylor MS, Smith JF, et al. 2012. A Systematic Revision of the Genus *Manekia* (Piperaceae). *Systematic Botany* 37: 587–598.

Silva WC, Ribeiro JD, Souza H de, et al. 2007. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. *Acta amazônica* 37: 293–298.

Souza Filho AP da S, Vasconcelos MAM, Zoghbi MGB, et al. 2009. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. *Acta Amazônica* 39: 389- 396.

Souza, V. C & Lorenzi, H. 2012. Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Stevens PF. 2001 onwards. Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]."
<<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>.<<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>

Sudmoon R, Tanee T, Wongpanich V, Bletter N & Chaveerach A. 2012. Ethnobotany and species specific molecular markers of some medicinal sakhnan (*Piper*, Piperaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: 1168-1175.

Tuler AC, Carrijo TT, Nóia LR, et al. 2015. SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). *Molecular Biology Reports* 42: 1501–1513.

Velloso JMC, 1829. Flora fluminensis. P. 24-27.

Yamamoto LF, Kinoshita LS, Martins FR, et al. 2007. Síndromes de polinização e de dispersão em fragmentos da Floresta Estacional Semidecídua Montana, SP, Brasil. *Acta*

Botanica Brasilica **21**: 553–573.

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**: 29-28.

Yuncker TG. 1974. The Piperaceae of Brazil III – *Peperomia*; Taxa of uncertain status. *Hoehnea* **4**: 71-413.

Zacaroni LM, Cardoso MG, Souza PE, et al. 2009. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Amazonica* **39**: 193–198.

CAPÍTULO I

The genus *Piper* L. (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brazil

Jheniffer Abeldt Christ^{1,3,5,6}, Valderes Bento Sarnaglia-Junior², Lucas Mesquita Barreto^{1,3},

Elsie Franklin Guimarães², Mário Luís Garbin⁴, Tatiana Tavares Carrijo^{1,3}



Submetido à "Rodriguésia" em 11 de dezembro de 2015

Aceito em 05 de abril de 2016

Normas disponíveis em: <http://www.scielo.br/revistas/rod/iinstruc.htm>

The genus *Piper* L. (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brazil

Jheniffer Abeldt Christ^{1,3,5,6}, Valderes Bento Sarnaglia-Junior², Lucas Mesquita Barreto^{1,3}, Elsie Franklin Guimarães², Mário Luís Garbin⁴, Tatiana Tavares Carrijo^{1,3}

¹ Laboratório de Botânica, Universidade Federal do Espírito Santo/CCAUE, Alto Universitário, s.n., Guararema, CEP 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

² Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rua Pacheco Leão 915, Jardim Botânico, CEP 22460-030, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³ Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, CCA-UFES, Alto Universitário, s.n., Guararema, CEP 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas, Universidade Vila Velha. Rua Comissário José Dantas de Melo, s/n, Boa Vista, 29102770 - Vila Velha, ES – Brasil.

⁵ Part of the first author Master's thesis

⁶ Corresponding author: jhenifferabeldt@gmail.com

Short title: *Piper* L. (Piperaceae) in Mata das Flores State Park, ES, Brazil.

Financial support: FAPES for funding fellowship to J.A. Christ; FAPES/CNPq (grant number 59152982/2012) and Capes for fellowships to M.L. Garbin.

Resumo

A conservação e o manejo da Floresta Atlântica dependem de conhecimento confiável sobre quantas e quais espécies este bioma abriga. Inventários florísticos têm um importante papel neste processo, especialmente quando conduzidos em remanescentes pouco conhecidos com alta prioridade de conservação. Este trabalho apresenta o estudo realizado no gênero *Piper* (Piperaceae) no Parque Estadual de Mata das Flores, município de Castelo, Estado do Espírito Santo (ES). O estudo foi baseado na análise de espécimes herborizados, assim como observados a campo, em expedições realizadas de Fevereiro de 2012 a Agosto de 2015. Vinte espécies de *Piper* foram identificadas. Destas, *Piper dilatatum*, *P. macedoi* e *P. piliovarium* foram registradas pela primeira vez para o estado do Espírito Santo. *Piper bicornis*, espécie endêmica do ES e conhecida apenas para o Município de Santa Leopoldina, teve a sua distribuição geográfica expandida para o Município de Castelo. A maior parte das espécies de *Piper* no PEMF ocorre nas áreas de vale, e frequentemente próximas a cursos d'água. Tal fato gera preocupação em relação à conservação destas espécies, dado que estas áreas são justamente as mais afetadas pela expansão das áreas urbana e rural do entorno.

Palavras-chave: flora, Floresta Atlântica, taxonomia.

Abstract

The conservation and management of the Atlantic Forest depends upon reliable knowledge about how many and which species this biome shelters. Floristic inventories have an important role in this process, especially when conducted in poorly known remnants, with a high conservation priority. This paper presents the study of the genus *Piper* (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Castelo municipality, Espírito Santo State (ES). The study was based on the analysis of dried specimens, as well as those observed in the field, from February 2012 to August 2015. Twenty species of piper were identified. Amongst these species, *Piper dilatatum*, *P. macedoi* and *P. piliovarium* were recorded for the first time for the Espírito Santo State. *Piper bicornis*, an endemic species from ES and known only for the Santa Leopoldina municipality, had its geographical distribution expanded to the Castelo municipality. Most of the *Piper* species in the MFSP occur in valleys, and they are commonly found near watercourses. This is worrying given that these areas are just the most affected by the expansion of the rural and urban areas that surround the Park.

Keywords: Atlantic Forest, flora, taxonomy.

Introduction

Piperaceae is a basal angiosperm family that comprises about 3,615 species easily recognized by the branches with well-marked nodes, simple and alternate leaves, and small flowers grouped in spikes. The genera that occur in Brazil (*Manekia*, *Peperomia* and *Piper*) can be easily distinguished by habit. *Manekia* comprises climbing vines (Monteiro & Guimarães 2009), *Peperomia* comprises herbaceous (terrestrial or epiphytic) species (Monteiro & Guimarães 2008), while *Piper* includes tree and shrub species (Monteiro & Guimarães 2009).

The first contribution to the knowledge of Piperaceae in Brazil was the classic study of Miquel (1832) in the "*Flora Brasiliensis*". However, Yuncker (1972, 1973, 1974) provided the first comprehensive taxonomic monograph for the family in the country. This knowledge was organized in five monographs containing morphological descriptions, data about species geographical distribution, ecological aspects, taxonomic information, and identification keys. For 50 years, he collected information about 457 species of Piperaceae. This is the most important contribution to the taxonomy of Piperaceae in Brazil given that no similar contribution with the same comprehensiveness was provided later. Moreover, regional floras played an important role in broadening our understanding about Piperaceae, and revealing new species (e.g. Carvalho-Silva *et al.* 2015; Sarnaglia-Junior 2015).

Considering the South and Southeast regions of Brazil, the states of Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo and Santa Catarina are those with the largest number of taxonomic studies in Piperaceae (e.g. Carvalho-Okano & Alves 1998; Guimarães & Valente 2001; Guimarães & Monteiro 2006; Medeiros & Guimarães 2007; Bardelli *et al.*

2008; Monteiro & Guimarães 2008; Carvalho-Silva & Guimarães 2009; Monteiro & Guimarães 2009; Monteiro 2013; Carvalho-Silva *et al.* 2013). Most of these studies were made as part of floristic inventories within conservation units. Only the States of São Paulo and Santa Catarina have comprehensive surveys for Piperaceae species (Guimarães & Valente 2001; Guimarães & Carvalho-Silva 2012). Based on updated knowledge, Piperaceae comprise now 458 in Brazil (BFG 2015). The highest amount of species is currently registered in the southeast region (261), followed by the North (239), Northeast (147), south (132), and Midwest (112) regions (BFG 2015).

In the southeast region, the Rio de Janeiro state leads the ranking of species number with 183 taxa, followed by Minas Gerais with 164 species, São Paulo with 157 species, and Espírito Santo with 130 species (BFG 2015). Even though the states of Espírito Santo and Rio de Janeiro have similar areas (46,077.519 km² and 43,696.054 km², respectively), the former shelters 58% of all species present in the latter (BFG 2015). This difference in species richness is probably due, partly, to the presence of collection gaps in Espírito Santo.

The scenario of gap collections is worrying considering the increasing loss of vegetation cover in Espírito Santo state due to decades of agricultural and industrial activities, and the extraction of marble and granite (Paula 2006). Consequently, the current vegetation cover of the state is comprised by remnants of different sizes, and this is a small-scale example of the fragmentation of the Atlantic Forest as a whole (Ribeiro *et al.* 2009). Such fragmentation along with a lack of floristic richness data, severely limits the execution of ecological studies. Given these issues, this study was conducted in a Conservation Unit called Mata das Flores State Park (MFSP). The area in which the MFSP

is located is of high priority for conservation (Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica 2011). Here we present a floristic study of the genus *Piper*.

Material and Methods

Study site and fieldwork — This study was carried out in the Mata das Flores State Park. This conservation unit is adjacent to the urban area of the Castelo municipality, Espírito Santo (Fig. 1, 20°35'54"S; 41°10'53"W), and comprises one of the last remnants of Atlantic Forest in Southern Espírito Santo (IEMA 2014). The vegetation is classified as a lowland tropical rainforest (Oliveira-Filho 2005), with elevation ranging from 100-440 m asl. The total area of the MFSP comprises 800 ha divided in three forest fragments surrounded by livestock activities and plantations of *Coffea canephora* L. Other impacts to the vegetation of this Conservation Unit were the opening of roads for vehicle traffic, and trails for motocross practice in the past. The field expeditions for collection and observation of individuals were conducted from February 2012 to August 2015, with a periodicity of at least one daily excursion per month. The fertile samples were photographed, dried following the usual procedures for taxonomic studies (Peixoto *et al.* 2002), and included in VIES and RB herbaria (acronyms according to Thiers, continuously updated).

Taxonomic study — Specimens collected were identified based on specialized bibliographies for Piperaceae (Miquel 1832; Yuncker 1972, 1973, 1974) and, when necessary, images of nomenclatural types available in virtual sites were consulted (*e.g.*, Tropics, Global Plants, Reflora). Intraspecific levels were not considered here. The terms of morphological descriptions followed the concepts and terminology of Hickey & King (2000) and Radford *et al.* (1974). Measures were made on long or wide portions of the vegetative and reproductive structures. Taxonomic literature is according to Lawrence *et*

al. (1968) and Stafleu & Cowan (1979). Name abbreviations for authors follow Brummit & Powell (1992).

Results and Discussion

Twenty species occurs of *Piper* in MFSP. Vegetative characters, such as leaf blade asymmetric, venation pattern and pilosity of branches were useful in species identification. The most informative reproductive characters is the position of the spike, especially useful to delimit very similar species based on vegetative characters.

Piper dilatatum, *P. macedoi* and *P. piliovarium* are new records for ES. The detection of these new records after the last update of the Brazilian Flora Plant List in 2015, indicates that floristic inventories are still necessary to raise the knowledge of the species richness, especially in areas with collection gaps as de South of ES.

Most of *Piper* species in MFSP occur near from watercourses in the understory, or in disturbed areas of roadsides. Considering this, strategies for the conservation of *Piper* species in this Conservation Unit must necessarily consider the protection of lowland areas, which are daily affected by the surrounding urban and rural areas expansion.

Considering that the floristic composition of the Atlantic Forest remnants is a strong indicator of their conservation status, our results with *Piper* reveals that even small fragments may have high species richness.

Key to the species of *Piper* from the Mata das Flores State Park

1. Leaf blade with campilodromous venation; spike arranged in umbels
..... **19. *P. umbelatum***

1'. Leaf blade with other type of venation; spike solitary	2
2. Flower and fruit pedicellate	3
2'. Flower and fruit not pedicellate	4
3. Branches pubescent; leaf blade with apex acute to acuminate	3. <i>P. anisum</i>
3'. Branches pilose; leaf blade with apex attenuate	14. <i>P. miquelianum</i>
4. Leaf blade with acrodomous venation	2. <i>P. amalago</i>
4'. Leaf blade with eucamptodromous or camptodromous venation	5
5. Leaf blade with base asymmetric	6
5'. Leaf blade with base symmetric	17
6. Spike pendulum	7
6'. Spike erect, curved or slightly curved	8
7. Branches internodes larger than 6.5 cm long; spike larger than 15 cm long; floral bract glabrous	8. <i>P. cernuum</i>
7'. Branches internodes less than 6.5 cm long; spike less than 15 cm long; floral bract pubescent	7. <i>P. caldense</i>
8. Spike curved or slightly curved	9
8'. Spike erect	12
9. Leaf blade glabrous or puberulous; floral bract round	10
9'. Leaf blade scabrous; floral bract triangular	11
10. Leaf blade with apex attenuated; peduncle puberulous	9. <i>P. dilatatum</i>
10'. Leaf blade with acute apex acuminate; peduncle glabrous	11. <i>P. glabratum</i>
11. Leaf blade with 7 pairs of secondary veins; secondary venation anastomosed at the margin; stigma ligulate	1. <i>P. aduncum</i>

11'. Leaf blade with 5 pairs of secondary veins; secondary venation not anastomosed at the margin; stigma filiform	10. <i>P. gaudichaudianum</i>
12. Branches glabrous; leaf blade with base asymmetry larger than 8 mm ..	4. <i>P. arboreum</i>
12'. Branches glabrous or pilose; leaf base with asymmetry less than 8 mm	13
13. Petiole canaliculate; leaf blade base acute	14
13'. Petiole striate, leaf blade base cordate or round	16
14. Margin repandous	15. <i>P. permucronatum</i>
14'. Margin entire	15
15. Branches pilose; 5-6 pairs of secondary veins	13. <i>P. macedoi</i>
15'. Branches glabrous; 8 pairs of secondary veins	20. <i>P. vicosanum</i>
16. Leaf blade base of the cordate; venation not anastomosed at the margin; 4 stigmas	16. <i>P. piliovarium</i>
16'. Leaf blade base of the round; venation anastomosed at the margin, 3 stigmas	18. <i>P. tuberculatum</i>
17. Petiole striate; leaf blade base subcordate	17. <i>P. pubisubmarginalum</i>
17'. Petiole canaliculate; leaf blade base acute or obtuse	18
18. Venation camptodromous	12. <i>P. hoffmannseggianum</i>
18'. Venation eucamptodromous	19
19. Leaf blade with 4-pairs of arcuate secondary venation	6. <i>P. bowiei</i>
19'. 7 Leaf blade with 10 pairs of arcuate secondary veins	5. <i>P. bicornae</i>

1. *Piper aduncum* L.

(Fig. 2 a-c)

Shrub 3.0 m tall, branches pilose, without protrusions, internodes ranging from 4.9 to 7.7 cm. Petiole striate, sheath short, 0.22 to 1.05 cm long, pilose, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 13.1-22.3 x 3.5-6.5 cm, elliptic, ovate-elliptical, scabrous, base asymmetric, cordate, one size 2-6 mm shorter at the petiole, apex acute-acuminate, eucamptodromous venation, 7 pairs of secondary veins arcuate to the apex, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face abaxial, anastomosed on the margin, margin entire. Spike solitary, curved, 6.1-10.5 cm long, peduncle pilose. Flower not pedicellate, floral bract triangular, pubescent fimbriate, ovary glabrous, 4-stamens without glands, styles inconspicuous, 3-stigma, ligulate. Fruit not seen.

Selected specimens examined: 16.V.2013, fl., *J. A. Christ et al. 03* (VIES); 15.I.2013, fl., *T. T. Carrijo et al. 1583* (VIES); 15.I.2013, fl., *T. T. Carrijo et al. 1561* (VIES); 29.X.2013, fl., *J. A. Christ et al. 10* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 87* (VIES); 21.VIII.2015, fl., *J. A. Christ 95* (VIES); 21.VIII.2015, fl., *J. A. Christ 96* (VIES); 21.VIII.2015, fl., *J. A. Christ 97* (VIES); 21.VIII.2015, fl., *J. A. Christ 98* (VIES).

Piper aduncum resembles *P. macedoi* by the elliptical leaf blade with a similar type of venation and dimensions and secondary veins anastomosed in the leaf margin, but differs by the curved spikes. The species occurs in all states of Brazil, except in the states of Rio Grande do Norte and Sergipe (BFG 2015). In the state of Espírito Santo, there are collections for the municipalities of Alfredo Chaves, Domingos Martins, Ibitirama, Itarana, Iúna, Linhares, Marechal Floriano, Nova Venécia, Santa Teresa, São Roque do

Canaã, Serra, Venda Nova do Imigrante and Vitória (Species Link 2015). Few and isolated individuals of *P. aduncum* were observed always near from roadsides in the PEMF. Flower in May to November.

2. *Piper amalago* L.

(Fig. 2 d-f)

Shrub 2.0 m tall, branches pilose, branches without protrusions, internodes ranging 2.3-10 cm. Petiole striate, sheath invaginating, 0.5-1.3 cm long, pilose, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 6.6-15.1 x 3.9-10.0 cm, deltoid, pilose on abaxial veins, base symmetric, round, apex attenuated, acrodomous venation, 4-7 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to the middle of the main vein, not prominent on the face abaxial, anastomosed on the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 2.4-8.0 cm long, peduncle pilose. Flower not pedicellate, floral bract round, pubescent fimbriate, 5-6-stamens without glands, ovary glabrous, inconspicuous stylus, 3-stigma, thick. Fruits not pedicellate, globose, glabrous.

Selected specimens examined: 06.IV.2013, fr., *T. T. Carrijo et al.* 1722 (VIES); 02.II.2012, fl. & fr., *T. T. Carrijo et al.* 1628 (VIES); 16.V.2013, fl., *J. A. Christ* 02 (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ* 42 (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ* 43 (VIES).

Piper amalago differs from other *Piper* species occurring in the MFSP by deltoid leaves with acrodomous venation. The species occurs in Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo and Sergipe (BFG 2015). In the state of Espírito Santo, the species

were collected in the municipalities of Anchieta, Cachoeiro de Itapemirim, Castelo, Conceição da Barra, Guarapari, Iconha, Itapemirim, Linhares, Marataízes, Mimoso do Sul, Nova Venécia, Santa Teresa, Serra, Sooretama, Vila Velha and Vitória (Species Link 2015). *Piper amalago* is a frequent species in MFSP, showing an aggregated spatial distribution, and always near roadsides. Flower on October to February, and fruits on February to April.

3. *Piper anisum* (Spreng.) Angely

(Fig. 2 g-h)

Shrub 2.0 m tall, branches pubescent, without protrusions, internodes ranging 2.8-6.0 cm. Petiole striate, sheath short, 0.2-0.5 cm long, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 5.9-18.6 x 2.5-7.6 cm, asymmetric-elliptical, puberulous on abaxial veins, more densely pilose on midrib, base asymmetric, subcordate, one size ca. 2 mm shorter at the petiole, apex acute to acuminate, brochidromous venation, 7-10 pairs of secondary veins arcuate up to the apex, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face abaxial, anastomosed on the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 4.5-6.6 cm long, 0.52-1.0 cm diam., peduncle pilose. Flower no seen. Fruit pedicellate, globose-tetragonal, glabrous.

Selected specimens examined: 04.II.2013, fr., *T. T. Carrijo et al. 1654* (VIES); 19.I.2013, fr., *T. T. Carrijo et al. 1614* (VIES); 04.III.2013, fr., *T. T. Carrijo et al. 1690* (VIES); 04.III.2013, fr., *T. T. Carrijo et al. 1693* (VIES); 17.III.2014, fr., *T. T. Carrijo et al. 2030* (VIES); 16.V.2013, fr., *J. A. Christ et al. 04* (VIES); 16.V.2013, fr., *J. A. Christ 5* (VIES); 16.V.2013, fr., *J. A. Christ 6* (VIES); 4.XII.2014, fr., *J. A. Christ 59* (VIES).

Piper anisum resembles *P. miquelianum* by the internodes evident, brochidromous venation and pedicellate fruits, but differs puberulous on abaxial veins, and spike larger than 3.4 cm. The species occurs Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro and São Paulo (BFG 2015). In the State of Espírito Santo, the species were collected in the municipalities of Alegre, Cariacica, Castelo, Conceição do Castelo, Itarana, Santa Leopoldina, Santa Maria de Jetibá, Santa Teresa and Vargem Alta (Species Link, 2015). *Piper anisum* is an understory species that shows aggregated spatial distribution, occurring preferentially in hillsides. Fruits on December to March.

4. *Piper arboreum* Aubl.

Shrub 3 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 4.9-7 cm. Petiole canaliculate, sheath invaginating, 1-2.5 cm, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 13-18 x 5.4-6.63 cm, elliptical to slightly lanceolate, glabrous, base asymmetric, round, one size 13-26 mm shorter at the petiole, apex acute to acuminate, eucamptodromous venation, 8 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 3.2-5.5 cm long, 0.15-0.25 cm diam., peduncle glabrous. Flower not pedicellate, floral bract triangular, glabrous, 4 stamens without glands, ovary glabrous, inconspicuous stylus, 3-stigma, filiform. Fruit not seen.

Selected specimens examined: 17.XII.2014, fl., *J. A. Christ et al.* 89; 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ* 26 (VIES).

Piper arboreum resembles *Piper pubisubmarginalum* by the leaf blade symmetric elliptic and spike erect, but differs by the base of the leaf blade asymmetric. The species

occurs in all states of Brazil, except in the state of Maranhão and Rio Grande do Norte (BFG 2015). In the state of Espírito Santo, the species was collected in the municipalities of Águia Branca, Alegre, Anchieta, Cariacica, Colatina, Conceição do Castelo, Domingos Martins, Ibirapu, Iconha, Itaúnas, Itapemirim, Linhares, Marechal Floriano, Marilândia, Mimoso do Sul, Nova Venécia, Rio Bananal, Santa Leopoldina, Santa Maria de Jetibá, Santa Teresa, São Lourenço, São Mateus, Serra, Sooretama, Vargem Alta, Viana, Vila Pavão and Vitória (Species Link, 2015). Just two individuals of this species were observed in MFSP, occurring in the understory near from a narrow trail within the forest. Flower on November and December.

5. *Piper bicorné* Carv.-Silva, E.F.Guim. & L.A.Pereira

(Fig.2 i-j)

Shrub 1.5-2 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 3.6-4.4 cm. Petiole canaliculate, sheath short, 0.28-0.61 cm, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 11.3-16.6 x 3.5-6.0 cm, elliptic, glabrous, base symmetric, obtuse, apex acuminate, eucamptodromous venation, 7-10 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 2.5-4.1 cm long, 0.27-0.49 diam., peduncle glabrous. Flower not seen. Fruit not pedicellate, angulate, glabrous.

Selected specimens examined: 02.II.2013, fr., *T.T. Carrijo et al. 1632* (VIES).

Piper bicorné resembles *P. piliovarium* by the leaf blade symmetric and venation shape, but differs by the base of the leaf blade obtuse. This species is endemic to Espírito

Santo state, and was recently published based on a collection from the municipality of Santa Leopoldina (Carvalho-Silva *et al.* 2015). The collection *T. T. Carrijo et al. 1632* (VIES) expands the geographic distribution of the species in Espírito Santo, from the municipality of Castelo. Just one individual of *Piper bicornis* was found in MFSP, occurring in the forest understory of valley areas. Fruits in February.

6. *Piper bowiei* Yunck.

(Fig. 2 k-l)

Shrub 1.5 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 4.9-7 cm. Petiole canaliculate, sheath short, 0.9-1.9 cm long, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 6.3-11.8 x 2.7-4.8 cm, elliptical to slightly lanceolate, glabrous, base symmetric, acute, apex acute to acuminate, eucamptodromous venation, 4 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to the middle of the main vein, not prominent on the face abaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 3.2-5.2 cm long, 0.15-0.19 cm diam., peduncle pilose. Flower not pedicellate, floral bract cuculate, pubescent fimbriate, 4-stamens without glands, ovary glabrous, stylus long, 3-stigma, ligulate. Fruit not seen.

Selected specimens examined: 21.XIII.2015, fl., *J. A. Christ 93* (VIES); 21.XIII.2015, fl., *J. A. Christ 94* (VIES).

Piper bowiei resembles *P. caldense* by the leaf blade symmetric and venation shape and leaf base acute, but differs by the glabrous branches, but differs from this species (and also for the others species) by the leaf blade with four pairs of secondary veins and ligulate stigma. The species occurs at Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Rio de

Janeiro and São Paulo (BFG 2015). In the state of Espírito Santo, *P. bowiei* was previously collected just on the municipality of Iúna by G.G. Hatschbach n. 3135 (NY, MO, MBM) (Species Link 2015). The collection *Christ et al.* 12 recorded the species in ES for the second time. *Piper bowiei* is an understory species in MFSP, occurring at hill slopes near watercourses. Just two individuals, close to each other, were observed. Flowers in August.

7. *Piper caldense* C.DC.

(Fig. 3 a-b)

Shrub 1.5 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 2-6 cm. Petiole canaliculate, sheath short, 0.4-0.85 cm long, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetrical, chartaceous, 8.5-20.6 x cm 2.7-8.1, elliptical, glabrous, base asymmetric, acute, one size 6-9 mm shorter at the petiole, apex acute, eucamptodromous venation, 5-7 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, pendulum, 2.1-4.4 cm long, 0.45-0.75 cm diam., peduncle glabrous. Flower not pedicellate, floral bract triangular, pubescent fimbriate, 4-stamens with glands, ovary glabrous, stylus inconspicuous, 3-stigma, filiform. Fruit not pedicellate, globose, glabrous.

Selected specimens examined: 13.II.2014, fr., *J. A. Christ et al.* 21 (VIES); 17.V.2013, fl., *T. T. Carrijo et al.* 1645 (VIES); 17.III.2014, fr., *T. T. Carrijo et al.* 2043 (VIES); 15.I.2014, fl., *T. T. Carrijo et al.* 1975 (VIES).

Piper caldense resembles *P. permucronatum* by the petiole canaliculate and by the leaves with similar foliar dimensions, number and position of the secondary veins.

However, *P. caldense* differs from *P. permucronatum*, as well as from the others species occurring at the MFSP, by the secondary venation glabrous on the abaxial side of the leaves and by the spikes pendulum. The species occurs in Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina and São Paulo (BFG 2015). In ES, *P. caldense* was collected on the municipalities of Afonso Cláudio, Águia Branca, Atílio Vivácqua, Castelo, Guarapari, Iúna, João Neiva, Linhares, Santa Teresa and Sooretama (Species Link 2015). *Piper caldense* is a relative common understory species, observed in spatially aggregated populations. Flower in January to May and fruits in February to March.

8. *Piper cernuum* Vell.

Shrub 5 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 6.5-10 cm. Petiole canaliculate, sheath invaginating, 3-6.3 cm, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade asymmetric, chartaceous, 20.4-43.6 x 8.7-15.1 cm, elliptical, glabrous, base asymmetric, cordate, one size 23-58 mm shorter at the petiole, apex acute, eucamptodromous venation, 8 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, pendulum, 15.4-35.7 cm long, 0.45-0.78 cm diam., peduncle glabrous. Flower not pedicellate, floral bract triangular, glabrous, 4 stamens without glands, ovary glabrous, inconspicuous stylus, 3-stigma, ligulate. Fruit not seen.

Selected specimens examined: 16.IV.2015, fl., *J. A. Christ et al.* 92 (VIES).

Piper cernuum resembles *P. caldense* by the spike pendulum, but differs by the large spike. The species occurs in Acre, Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais,

Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina, São Paulo and Tocantins (BFG 2015). In ES, the species were collected in the municipalities of Águia Branca, Alegre, Alfredo Chaves, Baixo Guandu, Cariacica, Castelo, Domingos Martins, Itaguaçu, Marechal Floriano, Rio Novo, Santa Teresa, São Lourenço, Vargem Alta and Venda Nova (Species Link 2015). Just one individual of *P. cernuum* was observed in the MFSP, occurring near watercourses. This is an understory species, and the individual was observed near a narrow trail within the forest. Flowers in April.

9. *Piper dilatatum* Rich.

(Fig. 3 c)

Shrub 2 m tall, branches puberulous, without protrusions, internodes ranging 4.7-6.5 cm. Petiole striate, sheath short, 0.28-0.49 cm long, pilose, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade asymmetric, chartaceous, 8.7-15.1 x 6.9-4.5 cm, elliptical to ovate, puberulous mainly on the abaxial venation, base asymmetric, acute, one size 4-8 mm shorter at the petiole, apex attenuate, eucamptodromous venation, 5 pairs of secondary veins straight, arranged up to the middle of the main vein, venation, not prominent on the face adaxial, not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, curved, 4.2-5.2 cm long, 0.17-0.21 cm diam., peduncle puberulous. Flower not pedicellate, floral bract round, pubescent fimbriate, 4-stamens without glands, ovary glabrous, stylus inconspicuous, 3-stigma, filiform. Fruits not seen.

Selected specimens examined: 16.V.2013, fl., *J. A. Christ et al. 01* (VIES, RB); 19.X.2013, fl., *J. A. Christ et al. 08* (VIES); 11.XII.2014, fl., *J. A. Christ 73* (VIES); 11.XII.2014, fl., *J. A. Christ 74* (VIES).

Piper dilatatum resembles *P. gaudichaudianum* by the leaf base acute, asymmetric, secondary veins straight and curved spike, but differs by the leaf blade with apex attenuate and floral bracts round. The species occurs in Acre, Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, São Paulo and Tocantins (BFG 2015). The first record of *P. dilatatum* in ES resulted from a collection made at MFSP, and was updated at BFG (2015). Individuals of this species were observed just near roadsides and were grouped in space, always near *P. gaudichaudianum* individuals. Flowers in October to May.

10. *Piper gaudichaudianum* Kunth

(Fig. 3 d)

Shrub 2 m tall, branches pilose, without protrusions, internodes ranging 3-7.2 cm. Petiole striate, sheath short, 0.32-0.76 cm long, pilose, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade asymmetric, chartaceous, 6.7-15 x 2.9-6.7 cm, elliptical, sometimes asymmetric, scabrous mainly at the abaxial venation, base asymmetric, acute, one size 2-4 mm shorter at the petiole, apex acute to acuminate, eucamptodromous venation, 5 pairs of secondary veins straight arranged up to or little above the middle of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, curved, 3-6.7 cm long, peduncle pilose. Flower not pedicellate, floral bract triangular, pubescent fimbriate, 4-stamens without glands, ovary glabrous, stylus

inconspicuous, 3-stigma, filiform. Fruits not pedicellate, oblong, laterally flattened, glabrous.

Selected specimens examined: 19.I.2013, fl. & fr., *T.T. Carrijo et al. 1612* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 44* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 45* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 46* (VIES).

Piper gaudichaudianum resembles *P. dilatatum* by the leaf base acute, asymmetric, secondary veins straight and curved spike, but differs by the apex of the leaf blade acute to acuminate and floral bracts triangular. This species occurs in Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina and São Paulo (BFG 2015). In ES, *P. gaudichaudianum* was collected on the municipalities of Águia Branca, Castelo, Cachoeiro de Itapemirim, Linhares, Santa Leopoldina, Santa Teresa, Sooretama and Venda Nova do Imigrante (Species Link 2015). Individuals of *Piper gaudichaudianum*, as well as of *P. dilatatum*, were observed just near roadsides and were grouped in space. Flowers in November to January and fruits in January.

11. *Piper glabratum* Kunth

(Fig. 3 e)

Shrub 1.5 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 2-4.4 cm. Petiole striate, sheath short, 0.22-0.67 cm long, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 10-17.2 x 3.9-7.5 cm, elliptical, puberulous at the abaxial venation, base asymmetric, acute, one size 3-6 mm shorter at the petiole,

apex acute to acuminate, eucamptodromous venation, 4 pairs of secondary arcuate, veins arranged up to or little above the middle of the main vein, not prominent on the face adaxial, not prominent on the face abaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, curve or slightly curved, 3.3-11 cm long, peduncle glabrous. Flower not pedicellate, floral bract round, pubescent, 4-stamens without glands, ovary glabrous, stylus inconspicuous, 3-stigma, filiform. Fruits not pedicellate, obpyramidal, angular, glabrous.

Selected specimens examined: 15.I.2013, fl. & fr., *T. T. Carrijo et al.* 1585 (VIES); 11.XII.2014, fl., *J. A. Christ* 77 (VIES); 11.XII.2014, fl., *J. A. Christ* 78 (VIES).

Piper glabratum resembles *P. macedoi* by leaves with asymmetric base and apex acute, but differs branches glabrous, leaves with pilosity puberulous at the abaxial side, 4-pairs of secondary veins, and fruits with an angular shape. This species occurs in Acre, Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rondônia, and São Paulo (BFG 2015). In ES, the species was collected on the municipalities of Vila Velha, Vitória, and Serra (Species Link 2015). Four individuals of *P. glabratum* were observed occurring near roadsides. Flowers on December to January and fruits in January.

12. *Piper hoffmannseggianum* Roem. & Schult.

(Fig. 3 f)

Shrub 1 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 3.2-4.2 cm. Petiole canaliculate, sheath short, 0.52-0.85 cm long, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 2.2-3.2 x 9.2-10.5 cm, elliptical,

glabrous, base symmetric, acute, apex acute to acuminate, camptodromous venation, 7-8 pairs of secondary arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 2.8-3.3 cm long, peduncle glabrous. Flower not pedicellate, floral bract triangular, glabrous, 4-stamens without glands, ovary glabrous, stylus inconspicuous, 4-stigma, filiform. Fruit not seen.

Selected specimens examined: 17.XII.2012, fl., *T. T. Carrijo et al. 1543* (VIES).

Piper hoffmannseggianum resembles *P. piliovarium* by the short internodes and leaf blade shape, but differs by the base of the leaf blade acute. This species occurs in Distrito Federal, Espírito Santo, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, and São Paulo (BFG 2015). In ES, the species was collected in the municipalities of Santa Leopoldina and Santa Teresa (Species Link 2015). Just one individual of this species was observed in MFSP, occurring in the forest understory. Flowers in December.

13. *Piper macedoi* Yunck.

(Fig. 3 g-h)

Shrub 1.5 m tall, branches pilose, without protrusions, internodes ranging 5-5.7 cm. Petiole canaliculate, sheath short, 0.38-0.52 cm long, pilose, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade asymmetric, chartaceous, 11-20 x 2.9-6 cm, elliptical, pilose on the abaxial venation, base asymmetric, acute, one size 2-4 mm shorter at the petiole, apex acute to acuminate, eucamptodromous venation, 5-6 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 9.3-11.3 cm long, peduncle pilose. Flower not seen. Fruit not pedicellate, angle, oblong, glabrous.

Selected specimens examined: 15.I.2013, fr., *T. T. Carrijo et al. 1586* (VIES).

Piper macedoi resembles *P. glabratum* by leaves with asymmetric base and apex acute, but differs branches pilose, leaves with pilosity at the abaxial side, 5-6 pairs of secondary veins and fruits with angular shape. This species occurs in the states of Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina, and São Paulo (BFG 2015). The first record of *P. macedoi* in ES resulted from a collection made at MFSP, and was updated in the BFG (2015). In MFSP, this species occurs near from the roadside. Fruits in January.

14. *Piper miquelianum* C. DC.

(Fig. 4 a-b)

Shrub 0.5 m tall, branches pilose, without protrusions, internodes ranging 2.2-6.3 cm. Petiole striate, sheath short, 0.22-0.41 cm long, puberulous, overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 4.6-13.7 x 3.2-8.6 cm, elliptical or ovate, pilose, base asymmetric, subcordate, one size ca. 2 mm shorter at the petiole, apex attenuate, brochidromous venation, 8-10 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 2.8-3.4 cm long, peduncle pilose. Flower pedicellate, floral bract round, glabrous, 4-stamens without glands, ovary glabrous, stylus inconspicuous, 4-stigma, acute. Fruit not seen.

Selected specimens examined: 10.XII.2013, fl., *J. A. Christ et al. 16* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 25* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 28* (VIES); 4.XII.2014, fl., *J. A. Christ 48* (VIES); 5.XII.2014, fr., *J. A. Christ 65* (VIES).

Piper miquelianum resembles *P. anisum* by the brochidromous venation and pedicellate flowers, but differs from this species by the leaf blade pilose and spike up to 3.4 cm long. This species occurs in Bahia, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo (BFG 2015) and Espírito Santo (Species Link 2015). This species was not listed from ES by BFG (2015). However, besides the collection made at MFSP reported here, *P. miquelianum* was previously collected on the municipalities of Castelo, Domingos Martins and Linhares (Species Link 2015). In MFSP, groups with 3-6 individuals were observed exclusively near watercourses in the forest understory. Flowers in November and December.

15. *Piper permucronatum* Yunck.

(Fig. 4 c)

Shrub 2 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 2.1-6.3 cm. Petiole canaliculate, sheath short, 0.37-0.81 cm long, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 10.9-15.8 x 3.8-6.6 cm, elliptical, puberulous on the abaxial venation, base asymmetric, acute, one size 2-6 mm shorter at the petiole, apex acute, eucamptodromous venation, 5-7 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation anastomosed at the margin, margin repand. Spike erect, 2.4-3.3 cm long, peduncle glabrous. Flower not pedicellate, floral bract triangular, pubescent fimbriate, 4-stamens

without glands, ovary glabrous, stylus inconspicuous, 3-stigma, filiform. Fruit not pedicellate, globose, glabrous.

Selected specimens examined: 25.II.2013, fl., *T. T. Carrijo et al.* 1668 (VIES); 17.V.2014, fr., *J. A. Christ et al.* 7 (VIES).

Piper permucronatum resembles *P. caldense* by the petiole canaliculate, by the size of the foliar blade and by the similar number of secondary veins, but differs in the secondary venation puberulous on the abaxial side of the leaves and by the spikes erect. This species occurs in the states of Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, and São Paulo (BFG 2015). In ES, the species was previously collected by the municipality of Castelo (Goldenberg, R. UPCB 76345) (Species Link 2015). In MFSP, *P. permucronatum* is an understory species. Flowers in February and fruits in May.

16. *Piper piliovarium* Yunck.

(Fig. 4 d-f)

Shrub 1-1.5 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 1.1-5.1 cm. Petiole striate, sheath short, 0.16-0.47 cm long, pilose, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 5.4-11.3 x 2.2-3.8 cm, elliptical, glabrous, asymmetric, base cordate, one side 2-4 mm shorter at the petiole, apex acute, eucamptodromous venation, 7-9 pairs of secondary veins curved, arranged up near to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 3.4-4.9 cm long, peduncle glabrous. Flower not pedicellate, floral bract triangular, pubescent fimbriate, 4-stamens without glands,

ovary pilose, stylus inconspicuous, 4-stigma, filiform. Fruits not pedicellate, globose, glabrous.

Selected specimens examined: 17.II.2013, fl. & fr., *T. T. Carrijo et al. s.n.* (VIES 35622); 02.II.2013, fr., *T. T. Carrijo et al. 1632* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 33* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 34* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 35* (VIES); 17.XI.2014, fl., *J. A. Christ 27* (VIES); 4.XII.2014, fl., *J. A. Christ 52* (VIES).

Piper piliovarium resembles *P. hoffmannseggianum* by the short internodes, but differs by the leaves with camptodromous venation and apex acute. This species occurs in the States of Minas Gerais and Rio de Janeiro (BFG 2015). The collection *T.T. Carrijo et al. s.n.* (VIES 35622) is the first record of *P. piliovarium* in ES, and was not updated in the BFG (2015). In MFSP, this is an understory species. The individuals show an aggregated distribution in space, occurring in areas of valleys. Flower on November to February and fruits on February.

17. *Piper pubisubmarginalum* Yunck.

(Fig. 4 g)

Shrub 1.5-2 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 3.8-4.3 cm. Petiole striate, sheath short, 0.32-0.88 cm long, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade asymmetric, chartaceous, 14-18.4 x 5.1-5.9 cm, lanceolate, puberulous on the abaxial venation, hirtellous in the intramarginal venation of the abaxial side, base symmetric, subcordate, apex acute, eucamptodromous venation, 7-12 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 0.9-

3.9 cm long, peduncle glabrous. Flower not seen. Fruit not pedicellate, globose, glabrous, pilose at the apex.

Selected specimens examined: 4.XII.2014, fr., *J. A. Christ 50* (VIES); 5.XII.2014, fr., *J. A. Christ 60* (VIES); 5.XII.2014, fr., *J. A. Christ 61* (VIES); 5.XII.2014, fr., *J. A. Christ 62* (VIES); 5.XII.2014, fr., *J. A. Christ 63* (VIES); 5.XII.2014, fr., *J. A. Christ 64* (VIES); 17.III.2014, fr., *T. T. Carrijo et al. 2038* (VIES).

Piper pubsubmarginalum differs from all other species of *Piper* occurring at MFSP by the leaves with subcordate base and fruit pilose at the apex. This species occurs in the states of Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais and Rio de Janeiro (BFG 2015). In ES, this species was previously collected on the municipalities Alegre, Cariacica, Marilândia, Santa Leopoldina, Santa Teresa and Vitória (Species Link 2015). In MFSP, *P. pubsubmarginalum* is an understory species. Groups of few individual were observed in areas of valleys, including secondary trails. Immature fruits in December to March.

18. *Piper tuberculatum* Jacq.

(Fig. 4 h)

Shrub 1.5-2 m tall, branches glabrous with protrusions, internodes ranging 1-4.2 cm. Petiole striate, overlapping the base of the blade, sheath invaginating, 0.3-0.8 cm, glabrous, not overlapping the base of the blade. Leaf blade asymmetric, chartaceous, 2.9-11.3 x 1.8-5.9 cm, oblong, elliptic or lanceolate, glabrous, base asymmetric, round, one size 3-7 mm shorter at the petiole, apex obtuse or acute, eucamptodromous venation, 6-8 pairs of secondary veins arcuate, arranged up to apex of the main vein, not prominent on the face adaxial, venation anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect,

1.8-5.4 cm long, peduncle pilose. Flower not pedicellate, bract floral triangular, pubescent fringed, 4-stamens without glands, ovary pilose, stylus inconspicuous, 3-stigma, filiform. Fruit not pedicellate, angulose, glabrous.

Selected specimens examined: 25.II.2013, fl. & fr., *T. T. Carrijo et al. 1666* (VIES); 11.XII.2014, fl., *J. A. Christ 66* (VIES); 11.XII.2014, fl., *J. A. Christ 67* (VIES); 11.XII.2014, fl., *J. A. Christ 68* (VIES).

Piper tuberculatum differs from all other species of *Piper* occurring at MFSP by the combination of branches with protrusions, petioles overlapping the base of the blade, and stigma filiform. This species is widely distributed in Brazil, except for the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Sergipe (BFG 2015). In ES, this species was previously collected on the municipalities of Linhares and Mimoso do Sul (Species Link 2015). In the MFSP, *P. tuberculatum* was observed in open areas near roadsides, often associated with *P. aduncum*. Flowers and fruits in December to February and fruit in February.

19. *Piper umbelatum* L.

Shrub 0,5-1 m tall, branches glabrous, without protrusions, internodes ranging 5-25 cm. Petiole canaliculate, sheath invaginating, 18-22 cm, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 19-25 x 24.2-32.1 cm, cordiform, glabrous, base symmetric, cordate, apex acuminate, campilodromous venation, 7 pairs of secondary veins, arcuate, venation not anastomosed at the margin, margin entire. Spike arranged as umbels 2-4, erect 3.1-9 cm long, peduncle pilose. Flower not pedicellate, bract

floral triangular-peltate, pubescent fringed, 2-stamens without glands, ovary glabrous, stylus inconspicuous, 3-stigma, filiform. Fruit not seen.

Selected specimens examined: 13.II.2014, fl., *J. A. Christ et al. 20* (VIES).

Piper umbelatum differs from all other species of *Piper* occurring at MFSP by the leaf blade cordiform and spikes arranged in umbels. The species occurs in all states of Brazil, except in the states of Amapá, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Piauí and Rio Grande do Norte (BFG 2015). The species was previously collected in ES on the municipalities of Água Branca, Cariacica, Colatina, Conceição da Barra, Domingos Martins, Governador Lindenberg, Ibitirama, Itarana, Iúna, Linhares, Nova Venécia, Santa Leopoldina, Santa Maria de Jetibá, Santa Teresa, Serra and Viana (Species Link 2015). In the MFSP, just one individual of this species was observed in an open area near a roadside. Flowers in February.

20. *Piper vicosanum* Yunck.

(Fig. 4 i)

Shrub 1.5-2 m tall, branches glabrous without protrusions, internodes ranging 3.9-6.4 cm. Petiole canaliculate, sheath invaginating, 0.72-1.0 cm, glabrous, not overlapping the base of the leaf blade. Leaf blade symmetric, chartaceous, 17.1-24.4 x 7.8-10.5 cm, elliptic, glabrous, base asymmetric, acute, one size 2-5 mm shorter at the petiole, apex acute, eucamptodromous venation, 8 pairs of secondary veins, arcuate, arranged up to apex of the main vein, prominent on the face adaxial, venation anastomosed at the margin, margin entire. Spike solitary, erect, 3.1-3.3 cm long, peduncle glabrous. Flower not seen. Fruit not pedicellate, angulose, glabrous.

Selected specimens examined: 17.XI.2014, fr., *J. A. Christ 36* (VIES); 17.XI.2014, fr., *J. A. Christ 37* (VIES); 17.XI.2014, fr., *J. A. Christ 38* (VIES); 17.XI.2014, fr., *J. A. Christ 40* (VIES); 4.XII.2014, fr., *J. A. Christ 51* (VIES); 4.XII.2014, fr., *J. A. Christ 54* (VIES); 4.XII.2014, fr., *J. A. Christ 55* (VIES); 4.XII.2014, fr., *J. A. Christ 56* (VIES); 4.XII.2014, fr., *J. A. Christ 57* (VIES); 4.XII.2014, fr., *J. A. Christ 58* (VIES); 11.XII.2014, fr., *J. A. Christ 75* (VIES); 11.XII.2014, fr., *J. A. Christ 76* (VIES).

Piper vicosanum resembles *P. caldense* by the petiole canaliculate, eucamptodromous venation and by venation anastomosed at the leaf margin, differing from this species by the leaves with to 17 cm long and spike erect. This species occurs in the states of Alagoas, Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Roraima, and São Paulo (BFG 2015). In ES, the species was previously collected on the municipalities of Águia Branca, Barra de São Francisco, Cachoeiro de Itapemirim, Castelo, João Neiva, Linhares, Marechal Floriano, Santa Teresa, São Mateus, Sooretama, Vila Pavão and Vitória (Species Link 2015). In the MFSP, isolated individuals of *P. vicosanum* were observed in valley areas of the forest understory and near roadsides. Fruits in November to December.

Acknowledgements: We thank Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo for logistical support; to IEMA (Espírito Santo environmental agency) for field support and licenses; FAPES, CNPq, and Capes (Espírito Santo and Brazilian research agencies) for funding (grant number 59152982/2012) and fellowships to M.L. Garbin; FAPES for fellowship to the first author; to Joelcio de Freitas for the illustration, and to Maurício F. Pogian for the map figure.

References

- BFG [The Brazil Flora Group]. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66(4):1085-1113.
- Bardelli, K.C.; Kirizawa, M.; Sousa, A. V. G. 2008. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil *Hoehnea*. 35: 553-561.
- Brummit, R.K.; Powell, C.E. 1992. Authors of plant names. Kew.
- Carvalho-Okano, R.M. & Alves, S.A.M. 1998. Piperaceae C. Agardh da Estação Experimental Mata do Paraíso, Viçosa, MG. *Acta Botânica Brasílica* 12: 497-513.
- Carvalho-Silva, M & Guimaraes, E.F. 2009. Piperaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica Universidade São Paulo* 27: 235-245.
- Carvalho-Silva, M., Guimarães, E.F. & Medeiros, E. V.S.S. 2013. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Piperaceae. *Boletim de Botânica Universidade São Paulo* 31: 27-40.
- Carvalho-Silva, M., Guimarães, E.F., Pereira, L.A., Sarnaglia Junior, V.B. 2015. Two new species of *Piper* section *Ottonia* (Piperaceae) from southeastern Brazil. *Phytotaxa*. 212: 293-299.
- Global Plants. [continuously updated]. Available from <<http://plants.jstor.org/>> . Accessed in 15 Nov 2013.

- Guimarães, E. F. & Monteiro, D. 2006. Piperaceae na Reserva Biológica De Poço Das Antas, Silva Jardim, Rio De Janeiro, Brasil. *Rodriguésia* 57: 567-587.
- Guimarães, E.F. & Valente, M.C. 2001. Piperaceae-*Piper*. In: Flora Ilustrada Catarinense, Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 104p.
- Guimarães, E.F.; Carvalho-Silva, M. 2012. Piperaceae *In*: Wanderley, M.G.W.; Shepherd, G.J.; Melhem, T.S.; Giulietti, A.M. & Martins, S.E. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Vol. 7., Instituto de Botânica, São Paulo. Pp. 263-320.
- Hickey, M.; King, C. 2000. The cambridge illustrated glossary of botanical terms. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- IEMA. Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos. 2014 Available from: <<http://www.meioambiente.es.gov.br/>>. Accessed in 6 Jan 2014.
- IPEMA. Instituto de Pesquisa da Mata Atlântica. 2011. Áreas prioritárias para conservação da Biodiversidade da Mata Atlântica no estado do Espírito Santo. 64p.
- Lawrence, G. H. M., Bucheim, A. F. G., Daniels, G. S. & Dolezal, H. (eds) 1968. Botanicum-Periodicum-Huntianum. Pittsburgh: Hunt Botanical Library, Bridson, G. D. R. (ed.) 1991. Botanicum-Periodicum-Huntianum/Supplementum. Pittsburgh: Hunt Institute for Botanical Documentation.
- Medeiros, E.V.S.S. & Guimaraes, E.F. 2007. Piperaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Boletim Botânico Universidade de São Paulo* 25: 227-252.
- Miquel, F.A.W. 1832. Chloranthaceae et Piperaceae. *In*: Martius, C.F.P. von; Eichler A. W. & Urban, I. (eds.). *Flora brasiliensis*, Lipsiae, Frid. Fleischer. Vol. 4. Pp 1-76.

Monteiro, D. & Guimarães, E.F. 2008. Flora do Parque Nacional Do Itatiaia – Brasil: *Peperomia* (Piperaceae). *Rodriguésia* 59: 161-195.

Monteiro, D. & Guimarães, E.F. 2009. Flora do Parque Nacional Do Itatiaia – Brasil: *Manekia* e *Piper* (Piperaceae). *Rodriguésia* 60: 999-1024.

Monteiro, D. 2013. Piperaceae em um fragmento de floresta atlântica da Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 64: 379-398.

Oliveira-Filho, A.T., Tameirão-Neto, E., Carvalho, W.A.C., Werneck, M., Brina, A.E, Vidal, C.V., Rezende, S.C. & Pereira, J.A.A. 2005. Análise florística do compartimento arbóreo de áreas de Floresta atlântica *sensu lato* na região das bacias do Leste (Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio De Janeiro). *Rodriguésia* 56: 185-235.

Paula, A. 2006. Os estados da Mata Atlântica: Espírito Santo. *In*: Campanili, M & Prochnow, M. Mata Atlântica: uma rede pela floresta. Brasília: RMA Pp. 114-128.

Peixoto, A.L., Rosa, M.M.T. da & Silva, I.M. 2002. Caracterização da Mata Atlântica. *In*: Sylvestre, L. da S. & Rosa, M.M.T. da. Manual metodológico para estudos botânicos na mata Atlântica. Seropédica, RJ: EDUR Pp. 09-23.

Radford, A.E., Dickinson, W.C., Massey, J.R.& Bell C.R. 1974. Vascular plant systematics. Harper & Row, New York.

Reflora. Herbário Virtual. Available from:
<<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>> Accessed in 17 Feb 2016.

- Ribeiro M.C., Metzger J.P., Martensen A.C., Ponzoni F.J., Hirota M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142:1141–1153.
- Species link. 2015. Available from: <<http://www.splink.org.br/>>. Accessed in in 19 Mar 2015.
- Sarnaglia Junior, V.B. & Guimarães, E.F. 2015. *Piper delirioi* (Piperaceae), a new species from southeastern Brazil. *Phytotaxa*. 201: 296-300.
- Stafleu, F. A.; R. S. Cowan. 1979. Taxonomic literature. A selective guide to botanical publications and collections with dates, commentaries and types. Vol 2.
- Thiers, B. 2015 [continuously updated]. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available at <<http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>> Accessed in 19 Mar 2015.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Available from: <<http://www.tropicos.org>> Accessed in 05 Sep 2014.
- 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.

Yuncker, T.G. 1974. The Piperaceae of Brazil III – *Peperomia*; Taxa of uncertain status.

Hoehnea 4: 71-413.

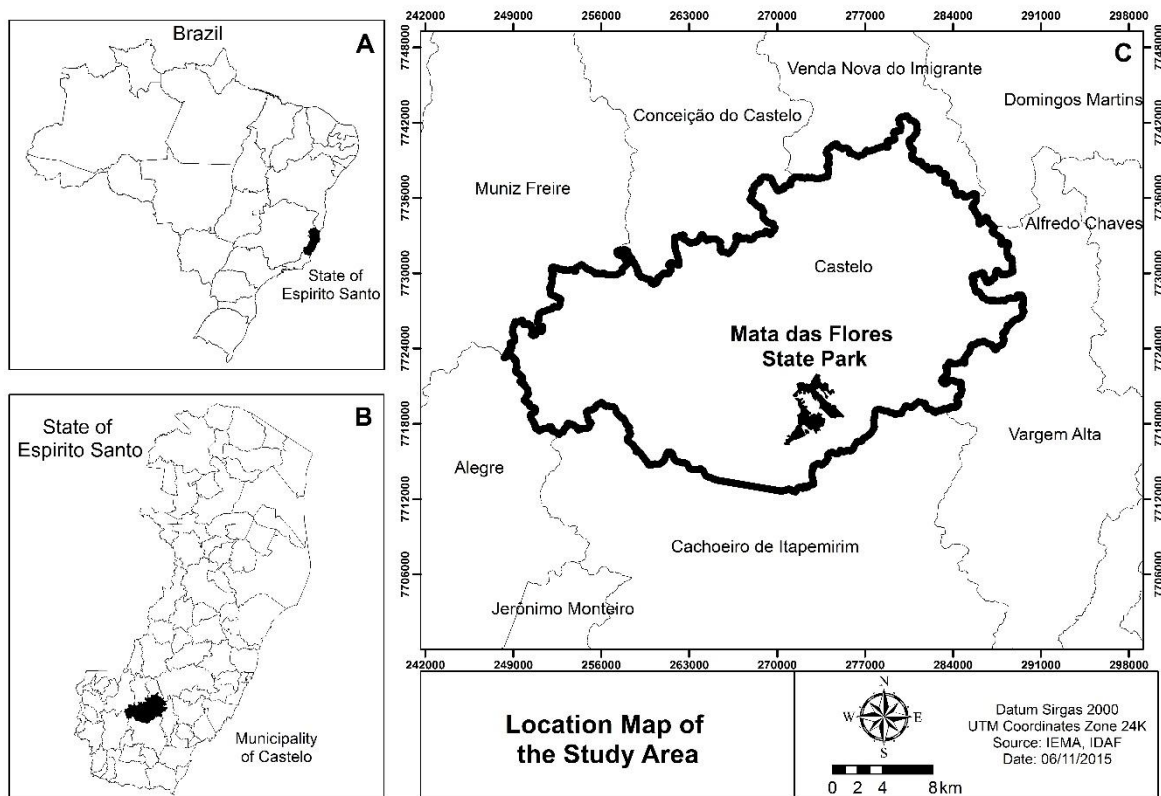


Figure 1. Location map of the study area. A - Brazil map highlighting the Espírito Santo state; B - Espírito Santo state highlighting the municipality of Castelo; C - Municipality OF Castelo highlighting the studied area (MFSP).

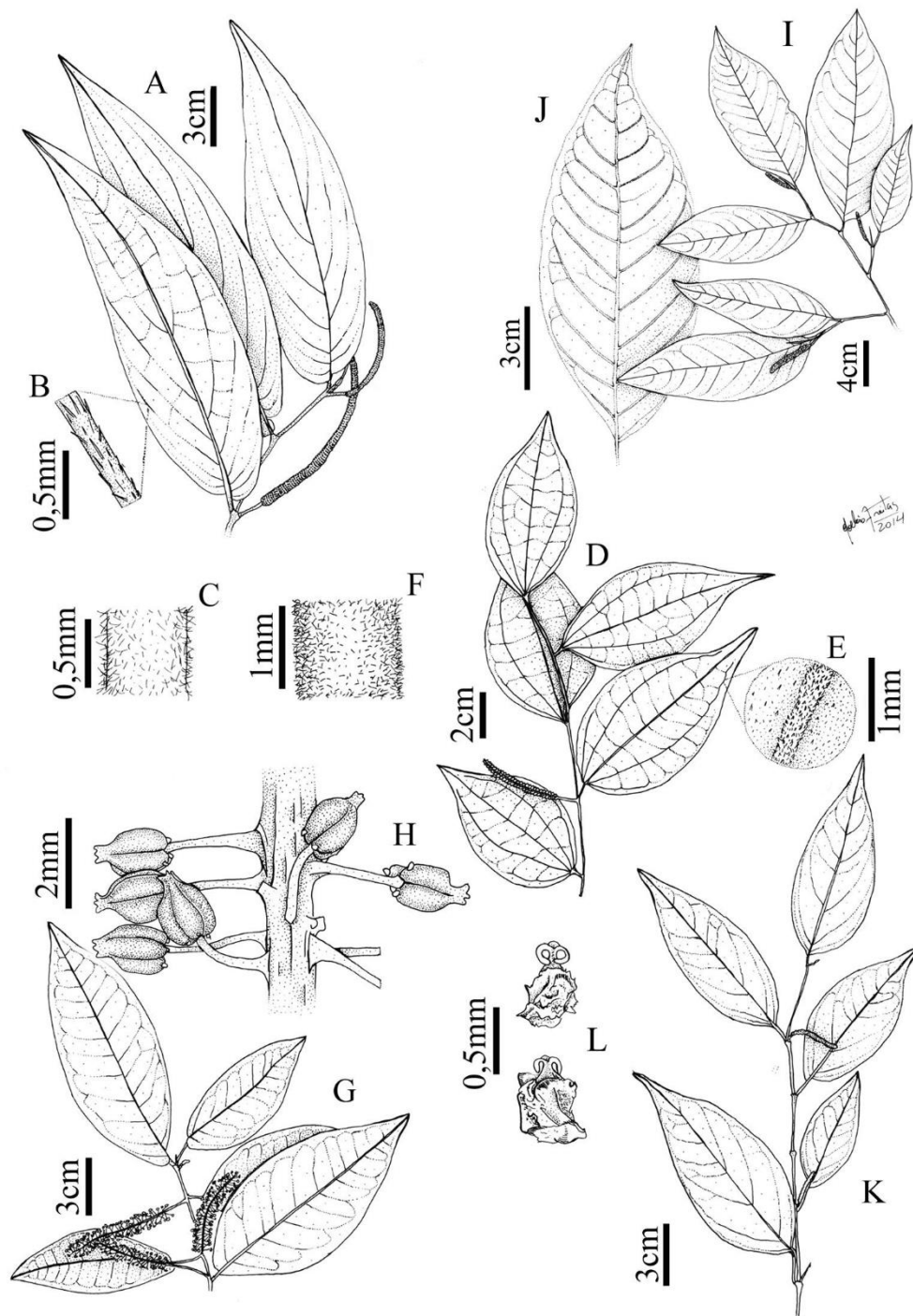


Figure 2. A-C. *Piper aduncum* L. (J.A.Christ *et al.* 03) - A. branches with spike; B. detail of trichomes in secondary veins; C. detail of trichomes in branches. D-F. *Piper amalago* L. (T.T. Carrijo *et al.* 1722) - D. branches with spike; E. detail of trichomes in secondary veins; F. detail of trichomes in branches. G-H. *Piper anisum* (Spreng.) Angely. (T.T. Carrijo *et al.* 1693) - G. branches with spike; H. detail of pedicellate fruit. I-J. *Piper bicorne* M. Carvalho-Silva, E.F. Guim. & L.A. Pereira (T.T. Carrijo *et al.* 1632) - I. branches with spike; J. detail form leaf and veins form. K-L. *Piper bowiei* Yunck. (J.A.Christ *et al.* 12) - K. branches with spike; L. detail of stigma ligulate.

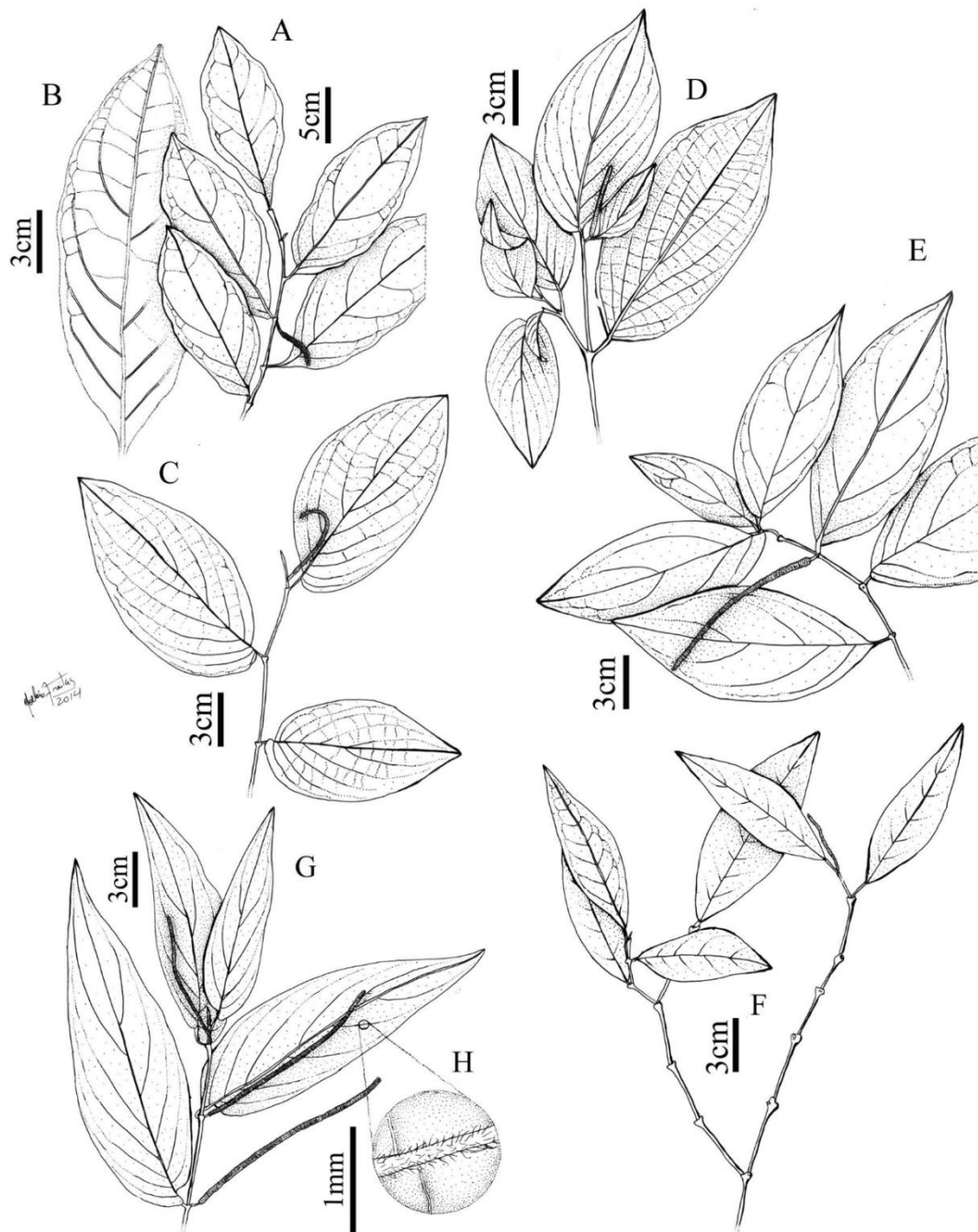


Figure 3. A-B. *Piper caldense* C.DC. (T.T.Carrijo *et al.* 1645) – A. branches with spike; B. detail of veins abaxial face. C. *Piper dilatatum* Rich. (J.A. *et al.* Christ 01) – branches with spike. D. *Piper gaudichaudianum* Kunth. (T.T. Carrijo *et al.* 1612) - branches with spike. E. *Piper glabratum* Kunth (T.T. Carrijo *et al.* 1585) – branches with spike. F. *Piper hoffmannseggianum* Roem. & Schult. (T.T.Carrijo *et al.* 1543) – branches with spike. G-H. *Piper macedoi* Yunck. (T.T.Carrijo *et al.* 1586) – G. branches with spike; H. detail of trichomes in secondary veins.

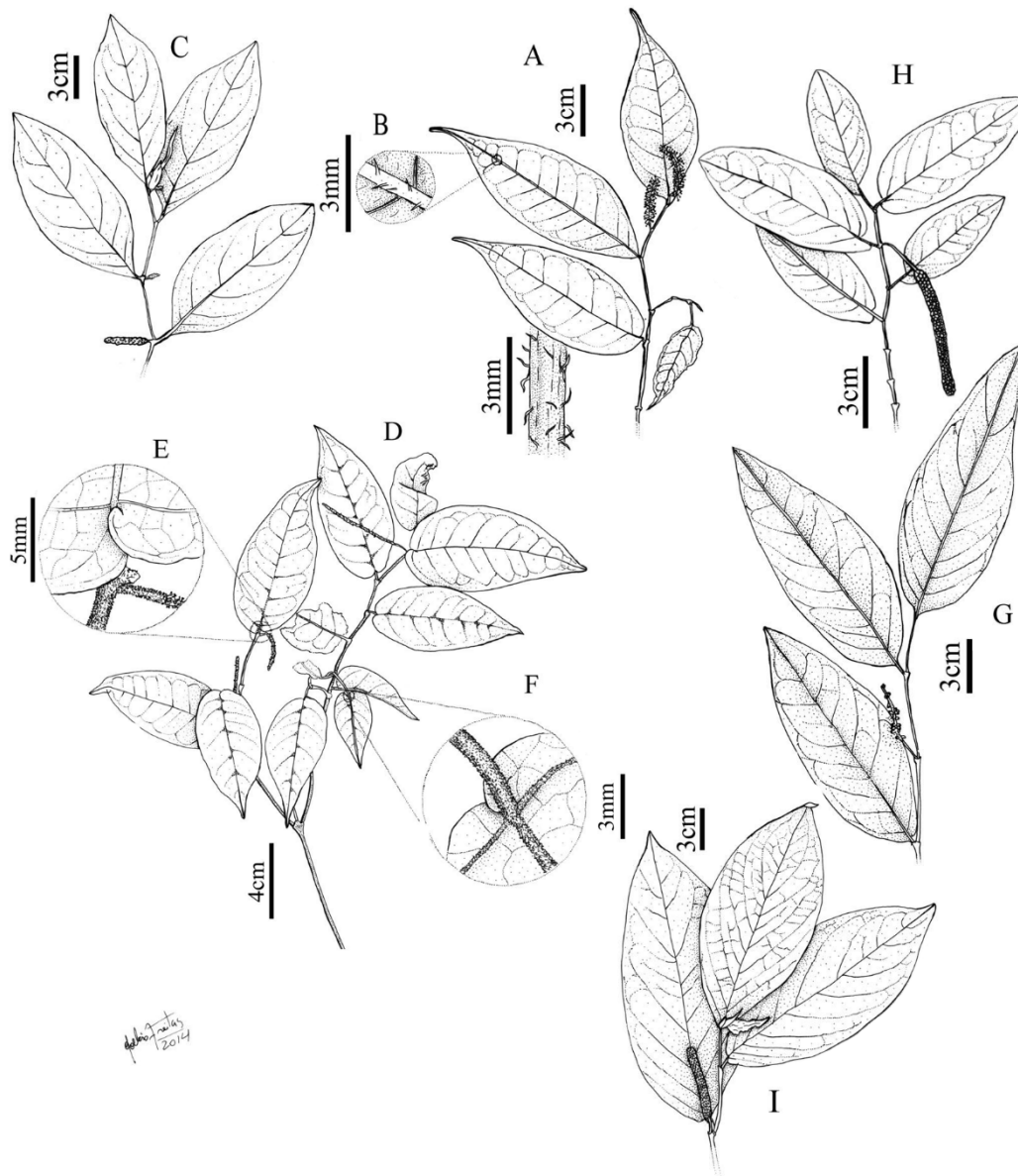


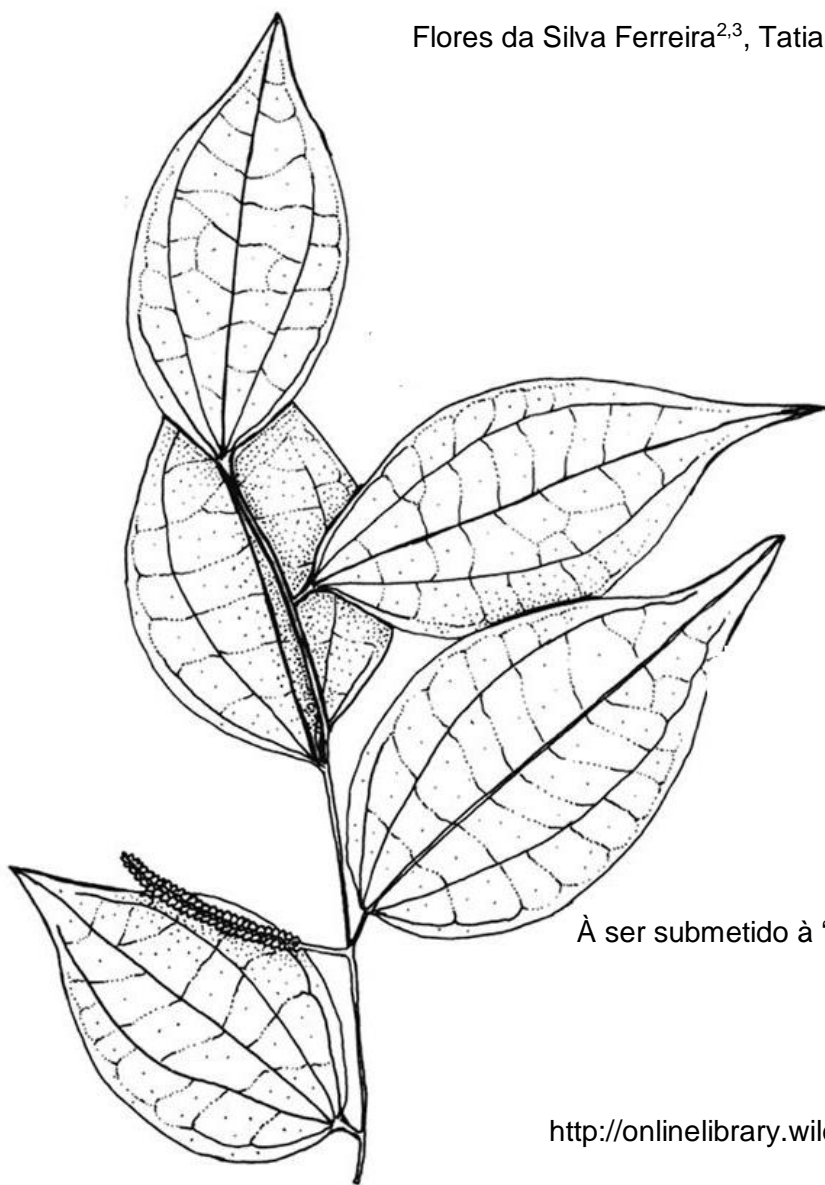
Figure 4. A-B. *Piper miquelianum* C.DC. (J.A.Christ *et al.* 16) - A. branches with spike; B. detail of trichomes in branches; F. detail of trichomes in veins. C. *Piper permucronatum* C.DC. (J.A.Christ *et al.* 7) - branches with spike. D-F. *Piper piliovarium* Yunck. (T.T.Carrizo *et al.* s.n.) – D. branches with spike; E. detail leaf whit base asymmetric; E. detail of trichomes petiole. G. *Piper pubisubmarginalum* Yunck. (T.T. *et al.* Carrizo 1688) – branches with spike. H. *Piper tuberculatum* Jacq. (T.T.Carrizo *et al.* 1666) – branches with spike; I. *Piper vicosanum* Yunck. (J.A.Christ *et al.* 17) – branches with spike.

CAPÍTULO II

***Fingerprinting* baseado na transferibilidade de marcadores SSR para identificação de espécies de *Piper* L. (Piperaceae)**

Jheniffer Abeldt Christ^{1,3,5}, Renan Köpp Hollunder^{1,4}, Marina Santos Carvalho^{2,3}, Marcia

Flores da Silva Ferreira^{2,3}, Tatiana Tavares Carrijo^{1,3,4}



À ser submetido à "Botanical Journal of the Linnean Society"

Normas disponíveis em:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1095-8339](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1095-8339)

**FINGERPRINTING BASEADO NA TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES SSR
PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *PIPER* L. (PIPERACEAE)**

JHENIFFER ABELDT CHRIST^{1,3,5}, RENAN KÖPP HOLLUNDER^{1,4}, MARINA SANTOS CARVALHO^{2,3}, MARCIA FLORES DA SILVA FERREIRA^{2,3}, TATIANA TAVARES CARRIJO^{1,3,4}

¹ Laboratório de Botânica, Universidade Federal do Espírito Santo, CCAE-UFES, Alto Universitário, s.n., Guararema, CEP 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

² Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, CCAE-UFES, Alto Universitário, s.n., Guararema, CEP 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

³ Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, CCAE-UFES, Alto Universitário, s.n., Guararema, CEP 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

⁴ Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical, CEUNES-UFES, Rodovia BR 101 Norte, Km 60, Bairro Litorâneo, CEP 29932-540, São Mateus, Espírito Santo, Brasil.

⁵ Autor para correspondência: jhenifferabeldt@gmail.com

RESUMO

Marcadores moleculares de DNA constituem uma alternativa ao uso de caracteres morfológicos para a distinção de espécies, dado que estes podem depender dos aspectos relacionados à fenologia ou serem variáveis em relação ao ambiente. Neste trabalho é apresentado um método que se baseia em *fingerprinting* de transferibilidade de marcadores microssatélites baseado na ausência ou presença da amplificação. *Primers* (51) desenvolvidos para quatro espécies de *Piper* foram testados para 16 espécies nativas da Floresta Atlântica. Os dados moleculares e morfológicos foram submetidos a análise de agrupamento, seguida de teste de nitidez de grupos. Um Heat map foi aplicado ao agrupamento. Uma árvore de regressão foi aplicada aos dados moleculares. Dos *primers* utilizados, 45 foram transferidos para no mínimo quatro espécies. Os dados moleculares foram mais eficientes em detectar grupos nítidos comparado aos dados morfológicos. Grupos de espécies delimitadas por um conjunto de caracteres morfológicos compartilhados foram diferenciadas com base nos dados moleculares. Espécies morfológicamente semelhantes podem ou não ser relacionadas do ponto de vista molecular. Nove *primers* se mostraram explicativos para identificar as 16 espécies estudadas. A técnica de *fingerprinting* de transferibilidade utilizada neste estudo demonstrou ser útil tanto à delimitação quanto para a identificação das espécies.

PALAVRAS-CHAVE ADICIONAIS: análises multivariadas – heat map - microssatélites
- morfologia - taxonomia.

INTRODUÇÃO

O entendimento dos limites entre as espécies é uma das questões fundamentais na classificação biológica, e tem impulsionado a discussão sobre quais seriam os marcadores mais eficazes para este fim (Duminil & Michele 2009). A morfologia é a principal fonte de dados informativos para a identificação de espécies de plantas, principalmente pela facilidade de observação dos caracteres morfológicos, inclusive em amostras herborizadas. No entanto, os caracteres morfológicos podem apresentar diversas limitações, tais como não estarem disponíveis durante maior parte do ano, como flores e frutos (Tuler *et al.*, 2015), estarem sujeitos a variação em função de característica do ambiente (Cardoso & Lamônaco 2003) ou serem subjetivos ou insuficientes para distinguir táxons (Nybom *et al.* 2014). Marcadores moleculares de DNA não apresentam tais limitações, proporcionando dados que podem ser integrados aos morfológicos no auxílio à taxonomia das espécies (Padiál *et al.*, 2010; Jörger & Schrödl, 2013).

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados no estudo de plantas para inferir aspectos filogeográficos e populacionais (Takayama *et al.*, 2006; Margis *et al.*, 2011; Casazza *et al.*, 2013), e estudos da relação evolutiva e de delimitação entre táxons (Chae *et al.*, 2014; Sharawy & Karakish, 2015; Samah *et al.*, 2016). Entretanto, estudos taxonômicos podem ser desafiadores quando se tratam de famílias e gêneros com elevada riqueza de táxons no Neotrópico, a exemplo do gênero *Piper*, subordinado à família Piperaceae. Este gênero está entre os 20 de maior riqueza de espécies em Angiospermas (Fronidin, 2004), e entre os 30 de maior riqueza de espécies no Brasil (BFG, 2015), incluindo 2000 espécies no mundo (Stevens, continuamente atualizado) e 272 espécies para o Brasil (BFG, 2015). Os caracteres morfológicos tradicionalmente empregados para circunscrever as espécies de *Piper* são observáveis nas flores diminutas, e nas folhas, que são variáveis quanto à forma e tamanho (Jaramillo & Manos,

2001). Outros, como forma dos frutos, dependem de amostras em determinado período reprodutivo, ou podem gerar dúvida em relação plasticidade, como a pilosidade de nervuras foliares e brácteas florais (v. Yuncker, 1972; Guimarães & Carvalho-Silva, 2009; Carvalho-Silva *et al.*, 2015).

Marcadores microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*), estão disponíveis para diferentes espécies do gênero *Piper* como *P. nigrum* L., de interesse econômico e *P. polysyphorum*, *P. cordulatum*, e *P. solmsianum* de interesse ecológico (Menezes *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2009; Andree *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2014). Devido ao seu polimorfismo, este marcador vem sendo utilizado como ferramenta auxiliar à discriminação de táxons através de *fingerprinting* (Duminil & Michele, 2014; Nybom *et al.*, 2014), sendo aplicado principalmente no melhoramento de plantas para seleção de variedades e cultivares (Arruda *et al.*, 2003; López-Olmos *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008). No entanto, a utilização de marcadores microssatélites é dependente da construção de bibliotecas genômicas (Jewell *et al.*, 2006), análises de sequenciamento de nova geração seguidas de buscas *in silico* (Vitória *et al.*, 2009), ou de análises de transferibilidade entre espécies relacionadas, dada a natureza conservada da ocorrência de muitos loci microssatélites em plantas e animais (Barbará *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2013; Jewell *et al.*, 2006).

A transferibilidade de *primers* microssatélites originalmente desenvolvidos para espécies cultivadas para espécies nativas relacionadas (Gupta & Varshney, 2000; Barbará *et al.*, 2007) é uma alternativa que diminui os custos e facilita o uso destes *primers* em diferentes espécies. Uma das várias possibilidades de uso destes marcadores é para estudos taxonômicos. A principal dificuldade em utilizar este marcador na delimitação de espécies nativas reside na necessidade de identificação de alelos exclusivos para as espécies de interesse dado sua natureza multialélica (Nybom

et al., 2014). Por essa razão, a utilização de marcadores microssatélites para fins de *fingerprinting* exige ampla amostragem de indivíduos. Isto nem sempre é viável em estudos com espécies nativas, dado que várias espécies apresentam distribuição geográfica restrita, sendo conhecidas por poucas localidades, ou por poucos indivíduos.

As regiões que flaqueiam os motivos repetidos hipervariáveis são conservadas (Gupta & Varshney, 2000). Nestas regiões são desenhados os primers para amplificação do microssatélite. Mutações do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e indels podem ser detectadas em taxa inferior àquelas ocorrentes nas regiões hipervariáveis (Bhargava & Fuentes, 2010). Dessa forma, mutações acumuladas nas regiões flanqueantes de microssatélites podem explicar a ausência da transferibilidade de *primers* entre táxons, podendo ser usada como um caracter informativo à delimitação de espécies. Neste sentido, o *fingerprinting* de transferibilidade como sugerido por Tuler *et al.* (2015), é uma abordagem alternativa de uso dos microssatélites para fins taxonômicos. Esse método se baseia na presença ou ausência da amplificação de *primers* microssatélites submetidos à transferibilidade para espécies de interesse. Neste caso, busca-se determinar *primers* exclusivos para as espécies, excluindo potenciais fontes de variação observadas no uso dos alelos.

Neste trabalho, foram analisados padrões de amplificação de *primers* microssatélites em espécies nativas do gênero *Piper* do Brasil. A intenção foi testar se as espécies estudadas podem ser identificadas com base em grupos específicos de marcadores SSR transferidos a partir de outras espécies do mesmo gênero. Para tanto, foram delineados os seguintes objetivos: 1. Testar a transferibilidade dos *primers* SSR originalmente desenvolvidos para *Piper nigrum*, *P. solmsianum*, *P. polysyphonum* e *P. cordulatum* para as espécies incluídas neste estudo; 2. Analisar comparativamente grupos de espécies formados com base em dados morfológicos e moleculares, e

identificar quais caracteres sustentam estes grupos; 3. Identificar a quantidade mínima de *primers* necessária à identificação de cada uma das espécies estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e análise dos dados moleculares — Este estudo incluiu dezesseis espécies de *Piper* ocorrentes em um fragmento de Floresta Atlântica localizado no Município de Castelo, estado do Espírito Santo, previamente identificadas por Christ *et al.* (prelo), a saber: *P. aduncum* L., *P. amalago* L., *P. anisum* (Spreng.) Angely, *P. arboreum* Aubl., *P. bowiei* Yunck, *P. caldense* C.DC., *P. cernuum* Vell., *P. dilatatum* Rich., *P. gaudichaudianum* Kunth, *P. glabratum* Kunth, *P. miquelianum* C.DC., *P. piliovarium* Yunck., *P. pubisubmarginalum* Yunck, *P. tuberculatum* Jacq., *P. umbellatum* L. e *P. vicosanum* Yunck. Expedições a campo para coleta das amostras foram realizadas entre agosto e dezembro de 2015 com periodicidade semanal de coleta. Folhas jovens e saudáveis de um à nove indivíduos foram coletadas de acordo com a ocorrência de cada espécie no fragmento em estudo. As folhas foram armazenadas em sílica gel e liofilizadas. O DNA genômico de representantes das espécies foi purificado usando o método de extração de Doyle & Doyle (1990). A partir da extração, a concentração e qualidade do DNA foi avaliada por determinação da razão A260 / A280 de absorvância por espectrofotometria. Para análise de transferibilidade foram avaliados 51 *loci* microssatélites desenvolvidos para *Piper solmsianum* (19) (Yoshida *et al.*, 2014), *P. cordulatum* (12) (Andree *et al.*, 2010), *P. nigrum* (9) (Menezes *et al.*, 2009), e *P. polysyphonum* (11) (Liao *et al.*, 2009) (apêndice 1). Uma amostra de DNA por espécie foi utilizada para as análises de transferibilidade. As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram preparadas com um volume final de 15µL contendo 50ng de DNA, 0,3µM de *primer*, 1,5 unidade de Taq DNA polimerase, tampão 1X contendo MgCl₂ (1x) e 0,2µM de dNTPs. As reações foram submetidas à fase inicial de desnaturação por um minuto

à 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 min à 94 °C, 1 min à 52 °C (sendo que nos 10 ciclos iniciais a temperatura foi diminuída em 1 °C, e nos demais ciclos a temperatura foi mantida à 42°C), 1 min à 72 °C com uma extensão final de 5 min 72°C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% corados com Gel Red em tampão de corrida TBE 1X (Trisbase, Ácido Bórico e EDTA) a 100 volts durante cerca de 2 horas. O tamanho dos fragmentos foi estimado usando escala de 100 pb. Os fragmentos foram fotografados sob luz ultravioleta utilizando o Sistema de Fotodocumentação (ChemiDocXRS + System– Bio-Rad™).

A transferibilidade de cada microssatélite foi codificada de forma binária como ausência (0) e presença (1) de amplificação por espécie. A matriz obtida foi utilizada para o cálculo de similaridade pelo índice de Jaccard e o agrupamento realizado com base no método de UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic means*). Associado ao agrupamento, foi realizado um teste de nitidez de grupos, buscando determinar um nível de partição ótimo (Pillar, 1999). A estabilidade do nível de partição foi testada pela reamostragem (10.000 iterações). Este teste mostra o quanto os grupos reaparecem nos dados reamostrados do que o esperado ao acaso (Pillar, 2006). Foi utilizado um nível de significância de 10% ($\alpha = 0.1$). Este teste foi aplicado de forma sequencial aos grupos de espécies formados pela aplicação do primeiro teste. O Heat map (Borcard *et al.*, 2011) foi aplicado ao agrupamento utilizando a matriz de distância e a matriz de presença/ausência das variáveis. Esta análise permite visualizar quais variáveis estão associadas aos grupos de espécies formados nos agrupamentos. Uma árvore de regressão multivariada (Borcard *et al.*, 2011) foi construída buscando determinar quantos *primers* são suficientes para identificar as espécies em questão. Todos os ramos à esquerda no dendograma informam ausência de amplificação do *primer*, enquanto os ramos à direita informam que o primer foi amplificado para a

espécie. O *loci* microssatélite que amplificou ou não para cada par de espécies foi indicado na bifurcação da ramificação (p. ex. X26, significa *primer* 26, apêndice 1). Os *loci* indicados pela árvore de regressão foram utilizados para a validação da transferibilidade incluindo todos os indivíduos amostrados para cada espécie. Os fragmentos foram observados em gel de agarose 1,2%, corados com gel red e fotografados sob luz ultravioleta. As análises foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2016), utilizando os pacotes *vegan* (Oksanen *et al.*, 2016), *cluster* (Maechler *et al.*, 2016), *tree* (Ripley, 2016) e *stats* (R Core Team, 2016). O teste de nitidez de grupos foi realizado no aplicativo Multiv (Pillar, 1999).

Amostragem, obtenção e análise dos dados morfológicos — Este estudo incluiu as vinte espécies de *Piper* do estudo realizado por Christ *et al.* (prelo), a saber: *P. aduncum*, *P. amalago*, *P. anisum*, *P. arboreum*, *P. bicornis* Carv.-Silva, E.F.Guim. & L.A. Pereira, *P. bowiei*, *P. caldense*, *P. cernuum*, *P. dilatatum*, *P. gaudichaudianum*, *P. glabratum*, *P. hoffmannseggianum* Roem. & Schult. *P. macedoi* Yunck., *P. miquelianum*, *P. permucronatum* Yunck., *P. piliovarium*, *P. pubisubmarginalum*, *P. tuberculatum*, *P. umbellatum* e *P. vicosanum* Yunck. A escolha dos caracteres para compor as análises foi baseada em descrições taxonômicas de espécies do gênero elencando-se os caracteres mais informativos para distinção de espécies. Além disso, buscou-se utilizar principalmente caracteres vegetativos e de fácil observação. Caracteres quantitativos não foram incluídos nas análises dado a sobreposição de medidas entre as espécies. Uma matriz de 20 espécies por 31 caracteres morfológicos qualitativos codificados de forma multicategórica e binária (apêndice 2) foi construída e utilizada para a análise de agrupamento. Para esta análise foi utilizado o índice de Gower (1971), seguido de teste de nitidez de grupos (Pillar, 1999). Os agrupamentos foram gerados com base em UPGMA. Outra matriz com 20 espécies e 66 estados de caracteres (apêndice 3)

codificados de forma binária foi contruída, servindo de base para a elaboração do Heat map.

RESULTADOS

Análise dos dados moleculares

A porcentagem de transferibilidade variou entre as espécies de *Piper* dos 51 pares de *primers* SSR utilizados, 45 geraram amplicons para pelo menos quatro das 16 espécies avaliadas (Fig. 1), apresentando uma taxa de 50,49% de transferibilidade. O tamanho dos fragmentos observados está de acordo com o esperado baseado nas características de cada *loci*. A espécie estudada com a maior transferibilidade de microssatélites foi *P. umbelatum* (41 *primers*), seguido por *P. arboreum* (39), *P. bowiei* (38), *P. anisum* (37), *P. miquelianum* (36), *P. piliovarium* (30), *P. pubisubmarginalum* e *P. vicosanum* (29), *P. tuberculatum* (28), *P. cernuum* (22), *P. amalago* (21), *P. gaudichaudianum* (19), *P. glabratum* (16), *P. aduncum* (15), *P. dilatatum* (7) e *P. caldense* (5). A transferibilidade dos microssatélites também variou dependendo da espécie que deu origem aos microssatélites avaliados. Os *loci* oriundos de *P. solmsianum* apresentaram 181 de 304 amplificações positivas para as 16 espécies estudadas (ca. 59%), enquanto os valores para *P. nigrum* foram de 80 de 144 (ca. 55%), para *Piper cordulatum* foi 84 de 192 (ca. 43,75%) e *P. polysyphonum* foi 67 de 176 (ca. 38,06%).

O teste de nitidez de grupos realizado na análise de agrupamentos embasada nos perfis de amplificação de microssatélites revelou a formação de 2 grupos nítidos (Fig. 2). Este mesmo teste foi aplicado de forma sequencial revelando oito grupos nítidos resultantes da subdivisão de G1 e G2. *Piper tuberculatum* (G2), *P. pubisubmarginalum* (G3), *P. gaudichaudianum* (G5) e *P. aduncum* (G7) formaram grupos monoespecíficos. *Piper anisum*, *P. miquelianum*, *P. umbellatum*, *P. arboreum* e *P. bowiei* formaram o maior

agrupamento (G1), seguido de *P. glabratum*, *P. caldense* e *P. dilatatum* (G6), e de dois grupos com duas espécies cada, formado por *P. piliovarium* e *P. vicosanum* (G4) e *P. amalago* e *P. cernuum* (G8).

Nenhum grupo formado apresentou perfis de amplificação de *primers* exclusivos (Figura 1). O *primer* 17 amplificou somente para quatro espécies (*P. anisum*, *P. arboreum*, *P. bowiei* e *P. miquelianum*), e o *primer* 33 amplificou somente para (*P. arboreum*, *P. glabratum*, *P. miquelianum* e *P. umbellatum*). Outros *primers* (1 e 14) amplificaram para a maioria das espécies (exceto *P. vicosanum* e *P. caldense*, respectivamente). Dos grupos monoespecíficos, *P. pubisubmarginalum* (G3) apresentou a maior quantidade de perfis de amplificação de *primers* (29), seguido de *Piper tuberculatum* (G2) com 27, *P. gaudichaudianum* (G5) com 19 e *P. aduncum* (G7) com 15. Os grupos que apresentaram maior quantidade de perfis de amplificação compartilhados entre espécies foram G8 (36), G6 (29) e G1 (24).

A árvore de regressão (Fig. 3) revelou que nove microssatélites (1, 2, 3, 4, 5, 17, 26, 28 e 37) são suficientes para identificar qualquer uma das 16 espécies de *Piper* estudadas. A amplificação desses *primers* foi confirmada pela análise de transferibilidade com número de indivíduos aumentado.

Análise dos dados morfológicos

A análise de agrupamento embasada em dados morfológicos revelou a formação de 4 grupos nítidos quando aplicado o primeiro teste de nitidez de grupos (Fig. 4): *P. dilatatum* (G1), *P. amalago* (G2), *P. anisum* e *P. miquelianum* (G3) e *P. arboreum*, *P. umbellatum*, *P. bowiei*, *P. pubisubmarginalum*, *P. tuberculatum*, *Piper macedoi*, *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum*, *P. glabratum*, *P. piliovarium*, *P. bicorne*, *P. hoffmannseggianum*, *P. cernuum*, *P. vicosanum*, *P. caldense* e *P. permucronatum* (G4).

O teste de nitidez de grupos foi aplicado de forma sequencial e revelou oito grupos, resultantes da subdivisão de G3 em dois grupos e G4 em quatro grupos. *Piper dilatatum* (G1), *P. amalago* (G2), *P. anisum* (G3), *P. miquelianum* (G4) e *P. tuberculatum* (G7) formaram grupos monoespecíficos, enquanto *P. arboreum* e *P. umbellatum* agruparam formando G5, e *P. bowiei* e *P. pubisubmarginalum* agruparam formando G6. As demais 11 espécies agruparam formando G8 (*P. macedoi*, *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum*, *P. glabratum*, *P. piliovarium*, *P. bicornis*, *P. hoffmannseggianum*, *P. cernuum*, *P. vicosanum*, *P. caldense* e *P. permucronatum*).

O Heatmap (Fig. 4 e 5) evidenciou que todas as espécies compartilham de 20 a 23, dos 66 estados de caracteres morfológicos incluídos na análise, e apenas *Piper dilatatum*, *P. umbellatum*, *P. cernuum* e *P. amalago* apresentaram estados de caracteres exclusivos. *Piper dilatatum* (G1) compartilhou 23 caracteres morfológicos com as demais espécies estudadas, e se diferenciou por apresentar ramos (3) e pedúnculos pubérulos (13), exclusivamente. *Piper amalago* (G2) compartilhou 22 estados de caracteres morfológicos com as demais espécies estudadas, e se diferenciou por apresentar lâmina deltoide (16), como caractere exclusivo. Além desse caractere, *Piper amalago* se diferencia de todas as demais espécies por apresentar nervação acródroma. *Piper anisum* (G3) e *P. miquelianum* (G4) agruparam formando G3, e compartilham 23 e 22 caracteres com as demais espécies, respectivamente. Estas espécies se diferenciaram das demais por apresentar nervação broquidódroma (37) e flores pediceladas (52), e diferem entre si pelo indumento dos ramos (2 e 4), da lâmina foliar (12 e 14) e das nervuras (40 e 42) e pela forma do estigma (59 e 61) e do fruto (63 e 65). *Piper arboreum* e *P. umbellatum* (G5) compartilham 15 caracteres, como a pilosidade do ramo (1), simetria da folha (10) e tipo de ápice (32), e se diferem, por exemplo, pela forma da lâmina (19), forma da base da lâmina (25) e tipo de nervação (34). *Piper bowiei* e *P.*

pubisubmarginalum (G6) compartilham 14 caracteres, como o tipo de ápice (29), nervação e posição da nervura (34 e 39) e a forma do fruto (64) e diferem pela forma do pecíolo (5), simetria da lâmina foliar (9) e forma da lâmina (15) e estilete longo (57). *Piper tuberculatum* (G7) difere das demais espécies por apresentar ápice obtuso (30). Todas as 11 espécies que agruparam formando G8 apresentam lâmina elíptica (15), espiga solitária (45) e estilete inconspícuo (56). Algumas destas espécies apresentam caracteres exclusivos, como a base da folha obtusa (27) em *Piper bicorne*, a margem foliar repanda (20) de *P. permucronatum*, a nervação camptódroma (36) de *P. hoffmannseggianum*.

DISCUSSÃO

Os métodos analíticos multivariados empregados neste trabalho revelaram padrões que fazem sentido biológico tanto para os dados morfológicos quanto para os dados moleculares. Nove dos 45 padrões de amplificação dos *primers* transferidos foram suficientes para identificar as 16 espécies incluídas no estudo molecular. Os dados moleculares foram mais eficazes para formar os agrupamentos, dado que geraram menos grupos nítidos monoespecíficos em comparação aos dados morfológicos. Além disso, os grupos gerados pelos dados moleculares são, em geral, menores. Portanto, o objetivo principal deste trabalho, testar se as espécies estudadas do gênero *Piper* podem ser identificadas com base em grupos específicos de marcadores SSR transferidos a partir de outras espécies do gênero, foi atingido.

As taxas de transferibilidade podem ser explicadas pela relação entre as espécies para as quais os *primers* foram originalmente desenvolvidos e as espécies incluídas neste estudo. Isto porque a ausência de amplificação de *primers* a partir de transferibilidade pode se dar pelas diferenças genéticas nas regiões que flanqueiam os microssatélites ao longo da evolução, podendo revelar a distância evolutiva entre as

espécies (Gupta & Varshney, 2000; Barbará *et al.*, 2007). Além disso, espera-se que táxons que ocorrem mais próximos geograficamente, sejam mais similares entre si que o contrário (Pennington *et al.*, 2004). Neste sentido, dentre as espécies que deram origem aos *primers* utilizados, *Piper solmsianum* é a única nativa do Brasil (BFG, 2015) e foi, justamente, a espécie que apresentou a maior taxa de transferibilidade. *Piper nigrum* foi a segunda espécie com maior taxa de transferibilidade de *primers* para as espécies estudadas. Apesar de *P. nigrum* ser originária da China (Stevens continuamente atualizado), esta espécie é mundialmente cultivada há décadas, dado este que possivelmente influenciou positivamente a transferibilidade dos seus *primers*. *Piper cordulatum* restringe-se ao Panamá e Costa Rica (Trópicos, 2016) e *P. polysyphonum* ocorrem amplamente na China (Yung-chien *et al.*, 1982). Neste cenário, a ocorrência restrita dessas espécies devido ao isolamento geográfico pode estar influenciando a ausência de semelhança genéticas entre as espécies estudadas.

A morfologia ainda é um dos principais critérios para a delimitação de espécies por taxonomistas (Sattler & Rutishauser, 1997), apesar dos avanços no desenvolvimento de diferentes técnicas para este mesmo fim (Anand *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2015; Samah *et al.*, 2016). Idealmente, busca-se delimitar espécies por caracteres morfológicos que sejam de fácil observação e estáveis, se possível exclusivo, sendo geralmente entendidos como “bons” caracteres. No entanto, nem sempre um caractere exclusivo pode ser definido como um bom caractere. Nesse sentido, *Piper dilatatum*, *P. amalago*, *P. anisum*, *P. miquelianum* e *P. tuberculatum* formaram grupos nítidos monoespecíficos com base em dados morfológicos definidos principalmente por caracteres exclusivos (Figura 4). *Piper amalago* apresenta caracteres de fácil observação que claramente diferencia essa espécie das demais, corroborando com o agrupamento proposto por Yuncker (1972). Isso pode se dever principalmente ao uso, neste trabalho, do mesmo caractere utilizado por Yuncker (1972) para delimitar essas espécies. Já *Piper dilatatum*,

P. anisum, *P. miquelianum* e *P. tuberculatum* são delimitados por caracteres tênues. A pilosidade dos ramos por exemplo, pode variar conforme o ambiente e a pressão ambiental que a espécie está submetida (Pérez-Estrada, 2000). *Piper umbelatum*, *P. caldense* e *P. cernuum* apresentam caracteres exclusivos, e ainda assim não foram delimitadas pela análise de agrupamentos como grupos monoespecíficos com base em dados morfológicos devido ao compartilhamento de outros caracteres mais comuns no gênero. No entanto, essas espécies são claramente delimitadas quando utilizados caracteres moleculares.

A semelhança morfológica entre duas ou mais espécies pode refletir sua relação de parentesco, e o marcador molecular utilizado neste trabalho evidencia esta relação. *Piper dilatatum* e *P. gaudichaudianum* são espécies morfológicamente semelhantes (Yuncker, 1972), e as análises moleculares corroboram que se tratam de espécies estreitamente relacionadas. No entanto, essas espécies emergiram em grupos distintos nas análises de agrupamento embasadas em dados morfológicos. Isto ocorreu porque apesar da similaridade geral entre essas espécies, *P. dilatatum* apresenta ramos e pedúnculos pubérulos, o que representa um caractere exclusivo desta espécie. *Piper anisum* e *P. miquelianum* são duas outras espécies que exemplificam esta mesma situação, mas que diferente de *P. dilatatum* e *P. gaudichaudianum*, agruparam nas análises embasadas em dados morfológicos e moleculares. Estas espécies muito semelhantes entre si e diferem morfológicamente das demais espécies estudadas por apresentarem caracteres morfológicos exclusivos a ambas em comparação às demais espécies.

Uma outra situação complicada do ponto de vista taxonômico, é observada quando espécies morfológicamente diferentes são mais relacionadas entre si em comparação às espécies mais similares. *Piper tuberculatum* e *P. arboreum* foram

reveladas em grupos distintos nas análises morfológicas pelo segundo teste de nitidez de grupos, mas as análises moleculares evidenciam a relação entre essas espécies também observada na filogenia mais recente para o gênero (Jaramillo *et al.*, 2008). Essas espécies podem ser morfológicamente diferenciadas por caracteres como presença de protuberâncias no caule, tamanho da folha e tamanho da assimetria da folha, caracteres estes que não foram incluídos nas análises morfológicas apresentadas neste trabalho. A morfologia nem sempre acompanhou a relação entre espécies. Esse tipo de situação reforça o uso de marcadores moleculares para entender a relação entre de parentesco entre as espécies que pode não se evidenciada com base em dados morfológicos.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o *fingerprinting* de transferibilidade é uma ferramenta promissora para a delimitação e identificação de espécies de *Piper*. A transferibilidade de *primers* entre espécies foi eficiente, mesmo entre táxons que não são diretamente relacionados. Os dados moleculares se mostraram mais eficazes em comparação aos dados morfológicos para distinguir as espécies estudadas. A árvore de regressão demonstrou que apenas nove padrões de amplificação de *primers* são suficientes para identificar as 16 espécies estudadas, o que torna o método pouco laborioso e menos custoso frente outras alternativas de marcadores moleculares para fins taxonômicos. A técnica desenvolvida pode ser aplicada para outros táxons de Angiospermas, desde que existam primers desenvolvidos para algumas espécies.

AGRADECIMENTO

Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo pelo o apoio logístico; ao IEMA pelo apoio nos campo e licenças; a FAPES pelo

financiamento do projeto a qual este trabalho está vinculado e a FAPES/Capes pela concessão da bolsa ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- Anand KK, Srivastava RK, Chaudhary LB, et al. 2010.** Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabaceae) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. *Taiwania* **55**: 197–207.
- Andree K, Axtner J, Bagley MJ, Barlow EJ, et al. 2010.** Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 April 2010–31 May 2010. *Molecular ecology resources* **10**: 1098-1105.
- Arruda MCC, Miller RNG, Ferreira M, et al. 2003.** Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. *Plant Pathology* **52**: 236–244.
- Barbara T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, et al., 2007.** Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**: 3759-3767.
- Bhargava A & Fuentes FF. 2010.** Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology* **44**: 250–266.
- Borcard, D., Gillet, F. & Legendre, P. 2011.** Numerical ecology with R. **Springer, NewYork,NY,US.** 306 pp.
- Brazil Flora Group (BFG). 2015.** Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* **66**: 1085-1113.
- Cardoso GL & Lomônaco C. 2003.** Variações fenotípicas e potencial plástico de *Eugenia calycina* Cambess. (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado-vereda. *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 131–140.
- Carrijo TT, Garbin ML, Picanço Leite W, et al. 2013.** Pollen morphology of some related genera of Vernonieae (Asteraceae) and its taxonomic significance. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 1275–1283.
- Carvalho-Silva M, Guimarães EF, Pereira LA, et al. 2015.** Two new species of *Piper* section *Otonia* (Piperaceae) from southeastern Brazil. *Phytotaxa* **212**: 293.

Chae WB, Hong SJ, Gifford JM, et al. 2014. Plant morphology, genome size, and SSR markers differentiate five distinct taxonomic groups among accessions in the genus *Miscanthus*. *GCB Bioenergy* **6**: 646–660.

Casazza G, Grassi F, Zecca G, Mariotti MG, et al., 2013. Phylogeography of *Primula allionii* (Primulaceae), a narrow endemic of the Maritime Alps. *Botanical Journal of the Linnean Society* **173**: 637-653.

Doyle JJ & Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **2**:1213–1215.

Duminil J & Di Michele M. 2009. Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **143**: 528–542.

Fan L, Zhang MY, Liu QZ, et al., 2013. Transferability of newly developed pear SSR markers to other Rosaceae species. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**: 1271-1282.

Frodin DG. 2004. History and Concepts of Big Plant Genera. *Taxon* **53**: 753.

Gogosz AM, Boerger MRT, Negrelle RB, et al. 2012. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). *Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro* **63**.

Gower JC. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics* **27**: 623–637.

Guimarães EF & Carvalho-Silva M. 2009. Uma nova espécie e novos nomes em *Piper* seção *Ottonia* (Piperaceae) para o Sudeste do Brasil. *Hoehnea* **36**: 431–435.

Gupta PK & Varshney RK. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* **113**: 163–185.

James FC & McCulloch CE. 1990. Multivariate analysis in Ecology and Systematics: Panacea or Pandora's Box? *Annual Review of Ecology and Systematics*. **21**: 129-166.

Jaramillo MA & Manos PS. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* **88**: 706–716.

Jaramillo MA, Callejas R, Davidson C, et al. 2008. A phylogeny of the tropical genus

- Piper* using ITS and the chloroplast intron psbJ–petA. *Systematic Botany* **33**: 647–660.
- Jewell E, Robinson A, Savage D, et al., 2006.** SSR Primer and SSR taxonomy tree: Biome SSR discovery. *Nucleic acids research*, **34** (suppl 2), W656-W659.
- Jörger KM & Schrödl M. 2013.** How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers in Zoology* **10**:59
- Lee YH, Lee S, Lee DH, et al. 2008.** Differentiation of citrus bacterial canker strains in Korea by host range, rep-PCR fingerprinting and 16S rDNA analysis. *European Journal of Plant Pathology* **121**: 97–102.
- Legendre P & Legendre L 1998.** Numerical ecology. 2nd English edition. Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Liao PC, Gong X, Shih HC, et al. 2009.** Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci from an endemic species, *Piper polysyphorum* (Piperaceae). *Conservation Genetics* **10**: 1911–1914.
- Lima DF, Mauad AVS, da Silva-Pereira V, et al. 2015.** Species boundaries inferred from ISSR markers in the *Myrcia laruotteana* complex (Myrtaceae). *Plant Systematics and Evolution* **301**: 353–363.
- López-Olmos K, Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez N, et al. 2005.** AFLP fingerprinting for identification of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Rev. Mex. Fitopatol* **23**: 147–151.
- Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M, et al. 2016.** cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.0.4.
- Margis R, Turchetto-Zolet A, Cruz F et al., 2011.** Phylogeography of the disjunct *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *BMC Proceedings* **5**:12.
- Menezes IC, Cidade FW, Souza AP, et al. 2009.** Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper, *Piper nigrum* L. (piperaceae). *Conservation Genetics Resources* **1**: 209–212.
- Mousavizadeh SJ, Hassandokht MR & Kashi A. 2015.** Multivariate analysis of edible Asparagus species in Iran by morphological characters. *Euphytica* **206**: 445–457.
- Nybom H, Weising K & Rotter B. 2014.** DNA fingerprinting in botany: past, present,

future. *Investigative genetics* **5**: 1.

Oksanen J, Blanchet FG & Kindt R. 2016. Vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-1. 2010. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

Padial JM, Miralles A, De la Riva I & Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology* **7**: 1.

Pennington RT, Cronk QCB & Richardson JA. 2004. Introduction and synthesis: plant phylogeny and the origin of major biomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **359**: 1455–1464.

Pérez-Estrada LB, Cano-Santana Z & Oyama K. 2000. Variation in leaf trichomes of *Wigandia urens*: environmental factors and physiological consequences. *Tree Physiology* **20**: 629–632.

Pillar VD. 1999. How sharp are classifications? *Ecology* **80**:2508–2516.

Pillar VD. 2006. MULTIV; Multivariate Exploratory Analysis, Randomization Testing and Bootstrap Resampling. User's Guide v. 2.4. Available at <http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br/>

R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Ripley B. 2016. tree: Classification and Regression Trees. R package version 1.0-37. <https://CRAN.R-project.org/package=tree>

Samah S, De Teodoro Pardo CV, Serrato Cruz MA, et al. 2016. Genetic Diversity, Genotype Discrimination, and Population Structure of Mexican *Opuntia* sp., Determined by SSR Markers. *Plant Molecular Biology Reporter* **34**: 146–159.

Sattler R & Rutishauser R. 1997. The Fundamental Relevance of Morphology and Morphogenesis to Plant Research. *Annals of Botany* **80**: 571–582.

Sharawy S & Karakish EMAN. 2015. Taxonomic relationships of some species of *Orobanche* L. evidence from RAPD-PCR and ISSR markers. *Pakistan Journal of Botany* **47**: 437-452.

Stevens PF. 2001 onwards. Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]."

<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.<<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Takayama K, Kajita T, Murata JI, et al., 2006. Phylogeography and genetic structure of *Hibiscus tiliaceus*—speciation of a pantropical plant with sea-drifted seeds. *Molecular Ecology* **15**: 2871-2881.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>> Acesso em: 04 Jun. 2016.

Tuler AC, Carrijo TT, Nória LR, et al. 2015. SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). *Molecular Biology Reports* **42**: 1501–1513.

Victoria FC, da Maia LC & de Oliveira AC. 2011. In silico comparative analysis of SSR markers in plants. *BMC plant biology* **11**: 1.

Yoshida NC, Lima PF, Priolli RHG, et al. 2014. Isolation and characterization of nine polymorphic microsatellite loci in *Piper solmsianum* (Piperaceae). *Applications in Plant Sciences* **2**: 1300092.

Yuncker TG. 1972. The Piperaceae of Brazil I: *Piper* - Group I, II, III, IV. *Hoehnea* **2**: 19-366.

Yung-chien T, Pei-shan C & Pei-zhi Z. 1982. Piperaceae. In: Yung-chien, T. ed., Fl. Reipubl. Popularis Sin. **20**: 11-78

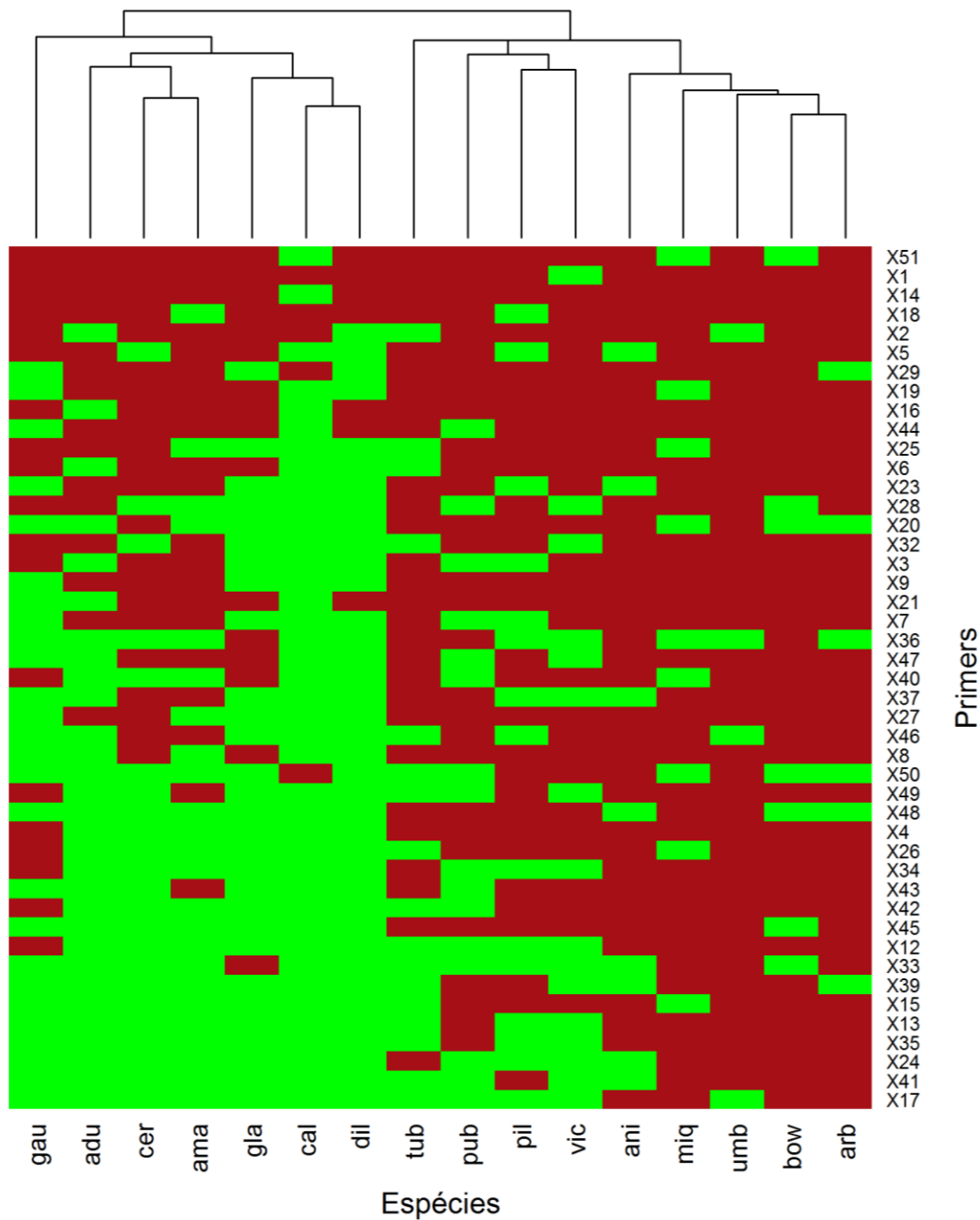


Figura 1. Heat map do perfil de amplificação dos 45 SSR por espécie: agrupamento de 16 espécies analisadas de género *Piper* (agrupamento vertical); agrupamento dos 45 marcadores originalmente desenvolvidos para *Piper solmsianum*, *P. cordulatum*, *P. nigrum* e *P. polysyphonum* (agrupamento horizontal) transferíveis para pelo menos quatro espécies deste estudo (apêndice 1). Bandas vermelhas representam presença de amplificação, e verdes ausência de amplificação. adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernnum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*; miq: *P. miquelianum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum*.

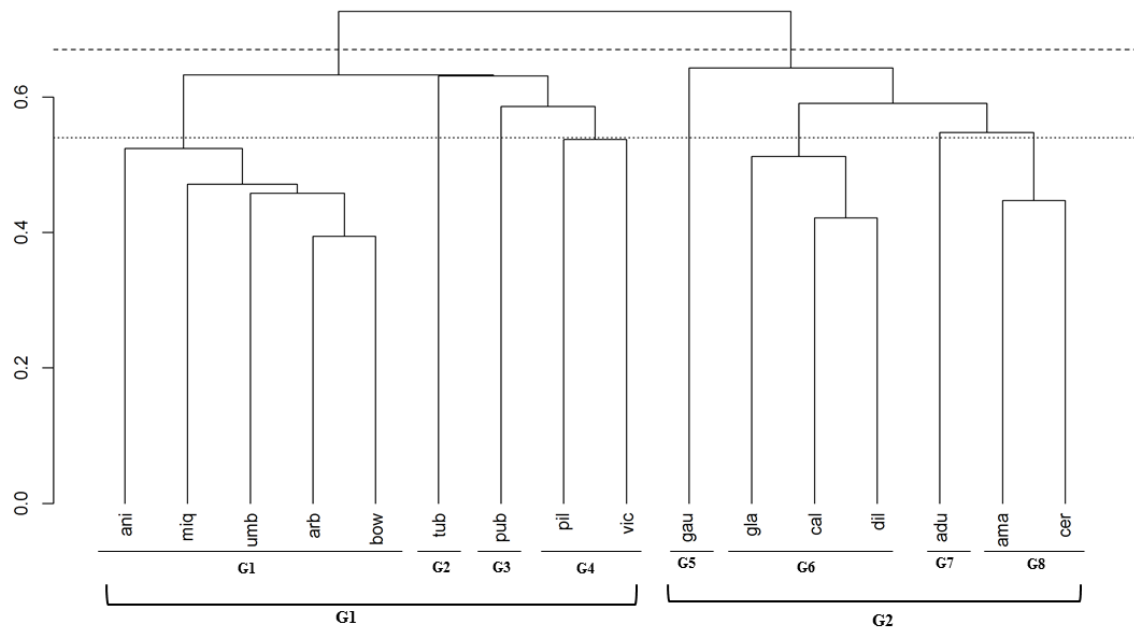


Figura 2. Grupos, indicados por colchetes, formados pela análise de agrupamento (UPGMA) com base na amplificação dos 45 *primers* SSR transferíveis para pelo menos uma espécie deste estudo (apêndice 1). A primeira linha indica a partição dos grupos considerando todas as espécies analisadas, e a segunda, a partição dentro dos grupos. adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernnum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*; miq: *P. miquelianum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum*.

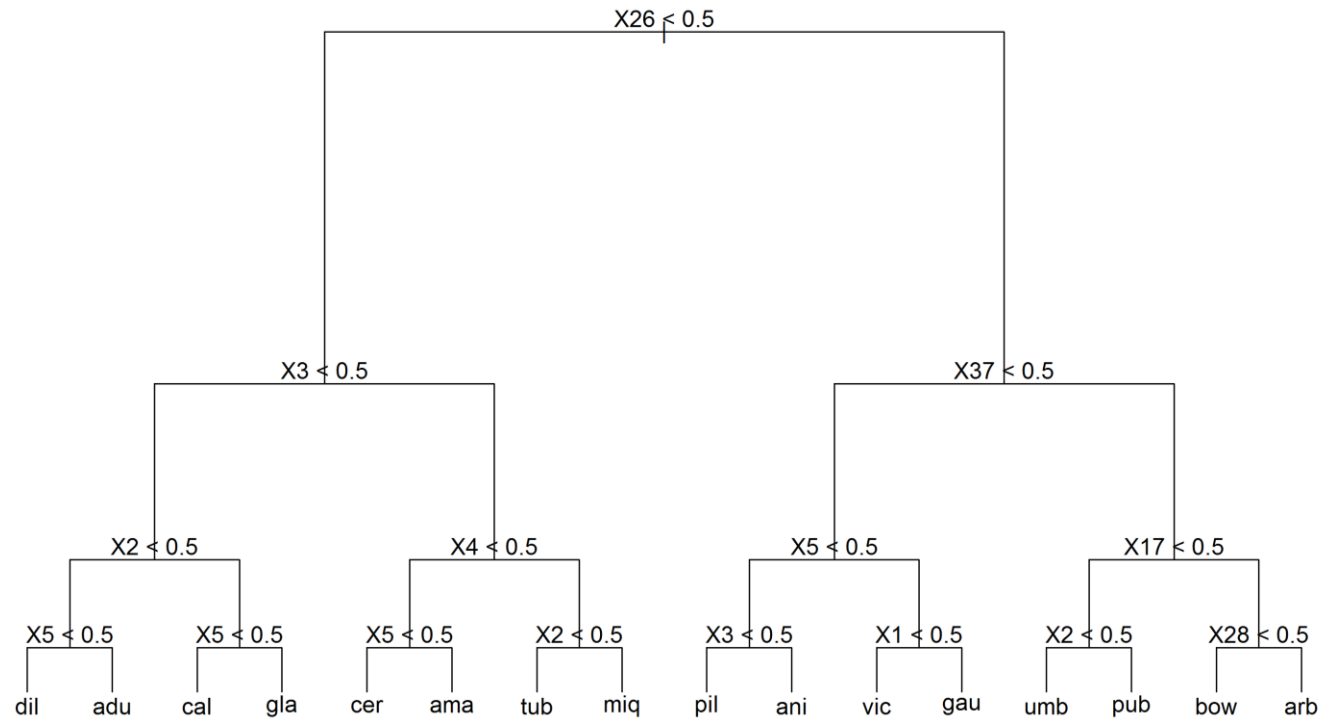


Figura 3. Árvore de regressão multivariada de caracteres moleculares de 16 espécies de *Piper*. Números representam *primers* (apêndice 1). As espécies são representadas por adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernnum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*; miq: *P. miquelianum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum*. Ramos à esquerda indicam ausência de perfis amplificação do primer, enquanto os ramos à direita indicam os perfis de ampliação dos primers. Esta figura demonstra que nove perfis de amplificação de primers são suficientes para identificar as 16 espécies de *Piper* estudadas.

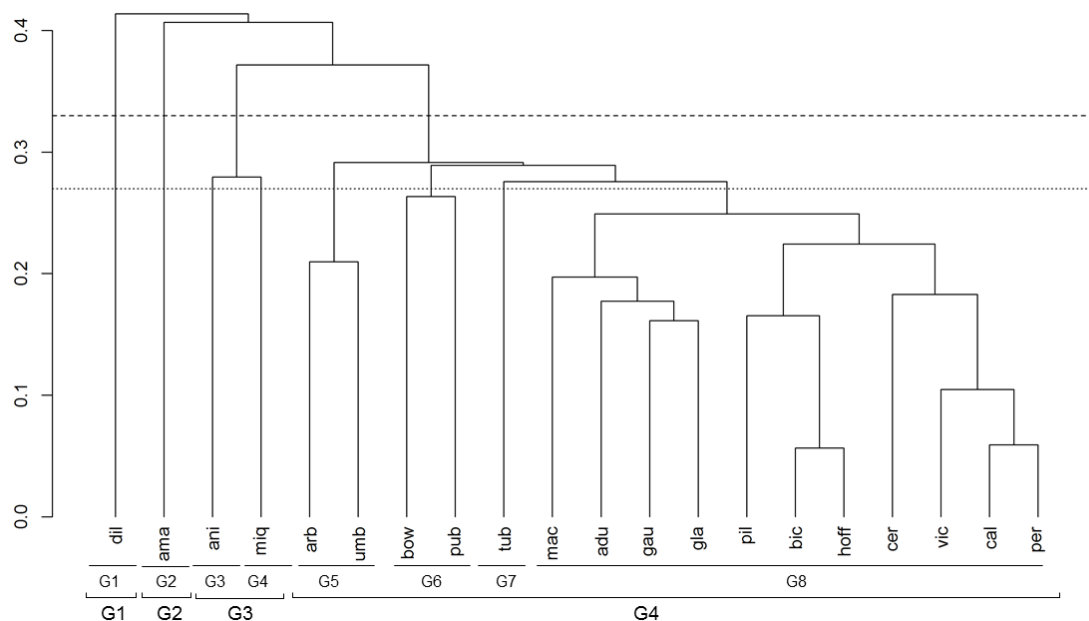


Figura 4. Grupos, indicados por colchetes, formados pela análise de agrupamento (UPGMA) com base em atributos morfológicos de *Piper* (apêndice 2). A primeira linha pontilhada indica a partição dos grupos considerando todas as espécies analisadas, e segunda linha, a partição dentro dos maiores grupos. adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bic: *P. bicornis*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernuum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*; hof: *P. hoffmannseggianum*; mac: *P. macedoi*; miq: *P. miquelianum*; per: *P. permucronatum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum*.

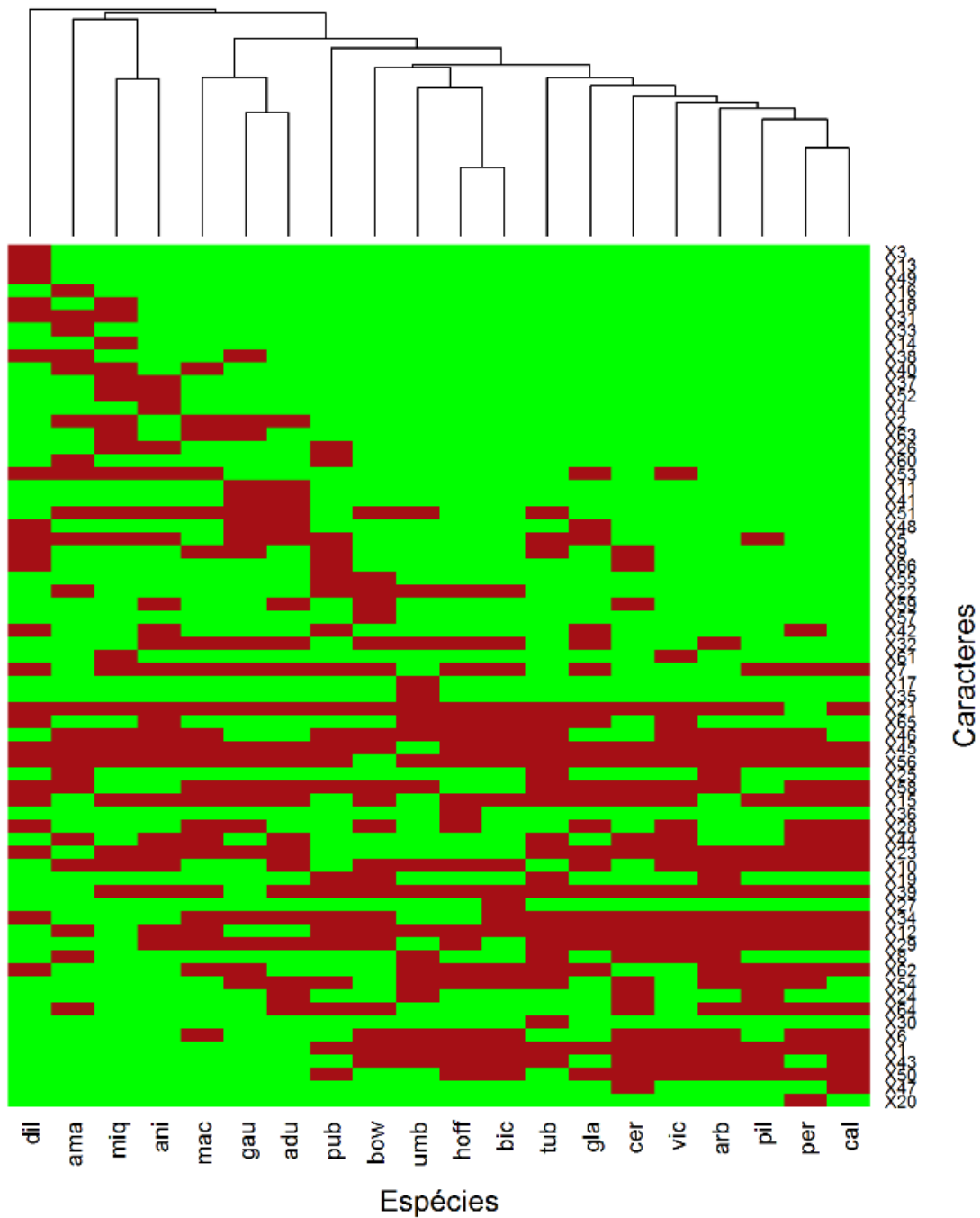


Figura 5. Heatmap dos 66 estados de caractere morfológicos por espécie: agrupamento de 16 espécies analisadas de género *Piper* (agrupamento vertical); agrupamento dos 66 estados de caractere morfológicos (agrupamento horizontal) (apêndice 3). Bandas vermelhas representam presença do caractere, e verdes ausência dos caracteres. adu: *P. aduncum*; ama: *P. amalago*; ani: *P. anisum*; arb: *P. arboreum*; bic: *P. bicornis*; bow: *P. bowiei*; cal: *P. caldense*; cer: *P. cernuum*; dil: *P. dilatatum*; gau: *P. gaudichaudianum*; gla: *P. glabratum*; hof: *P. hoffmannseggianum*; mac: *P. macedoi*; miq: *P. miquelianum*; per: *P. permucronatum*; pil: *P. piliovarium*; pub: *P. pubsubmarginalum*; tub: *P. tuberculatum*; umb: *P. umbelatum*; vic: *P. vicosanum*.

APÊNDICE 1. Primers desenvolvidos para *Piper solmsianum*, *P. cordulatum*, *P. polysyphonium* e *P. nigrum* utilizados neste estudo

Código	Espécie	Nome	Sequência 5' - 3'
1	<i>P. solmsianum</i>	Psol1F Psol1R	AGTCCTAACGGACCTGTGAA GAGGTGTTGTTGATGTGAGC
2	<i>P. solmsianum</i>	Psol2F Psol2R	CCTAACGGACCTGTGAGGTA TCGATTTACGTGCCGAGT
3	<i>P. solmsianum</i>	Psol3F Psol3R	GCGGATCTTACCAGAATCAG GAGTAGCCTTTGGTTGTTGC
4	<i>P. solmsianum</i>	Psol4F Psol4R	GCTTGTTCTTGTGGGAAACC CAGGAAAACATACCGTCGTC
5	<i>P. solmsianum</i>	Psol5F Psol5R	ACCTCTGTCATTTACCTTG GGGTGTGTTTTAGAAATGGA
6	<i>P. solmsianum</i>	Psol6F Psol6R	CTCTTGGCAAAGTCACCTG ATCCCATACCGATCTCCTTC
7	<i>P. solmsianum</i>	Psol7F Psol7R	TTGCTTACGCCTGGACTAAC CAAGATCTGAGTCCCCAGTG
8	<i>P. solmsianum</i>	Psol8F Psol8R	GGCAGATCAAGCTGAGAGAA GGATTTGGTGGTGGAGTGT
9	<i>P. solmsianum</i>	Psol9F Psol9R	GGAACCCACGAGTTTCTTG GGGGTCCTTTTTACGTTGAG
10	<i>P. solmsianum</i>	Psol10F Psol10R	CAGACGGATTCCCCTGAT GGACTTGTAACCCATCGAGA
11	<i>P. solmsianum</i>	Psol11F Psol11R	TTATTTGGTTGGAGCTGTGTG CCACGGTGGGTTATCACAC
12	<i>P. solmsianum</i>	Psol12F Psol12R	CCCTCGAACGAGAGAGAAG ATGGCCAGGGGAGTAAGATA
13	<i>P. solmsianum</i>	Psol13F Psol13R	ACGCAAAGTATTGCCTTAGC TTTAACCATCTTTCGGTCCA
14	<i>P. solmsianum</i>	Psol14F Psol14R	GCTCAACTCCGGAATCTACA GTATGCGTGCCGAGTGTTTA
15	<i>P. solmsianum</i>	Psol15F Psol15R	CGCGGACTAACAGAGTTAC GCCACAAAAACCCACTCA
16	<i>P. solmsianum</i>	Psol16F Psol16R	GAAGTCCTAACGGACCTGTG GAGGTGTTGTTGATGTGAGC
17	<i>P. solmsianum</i>	Psol17F Psol17R	TATCCCATGCGAGATGC CGGCATAACCACTAAACCAC
18	<i>P. solmsianum</i>	Psol18F Psol18R	ACTGTTGTGGACCTTGTTGC TGTATTAGGCCCCATCGAC
19	<i>P. solmsianum</i>	Psol19F Psol19R	CGCGTGATGCATGCTTAT GCTCAACTCCGGAATCTACA

20	<i>P. cordulatum</i>	PcoCA02F PcoCA02R	CAGCTCAAACACCAAACACC TTTGGGGTGATTCAAGTTCC
21	<i>P. cordulatum</i>	PcoCAAT01F PcoCAAT01R	TCATACACAGCCTCACACTGG GTTTGATTGATGGTGCGTTG
22	<i>P. cordulatum</i>	PcoCT04F PcoCT04R	ATATTTGTTGCCCATTGACC TCAGTTGATATGTCTGGATTGG
23	<i>P. cordulatum</i>	PcoCT05F PcoCT05R	TGCCTTTGTTTGCCTTCC CAATTTTCCAGTCACAAACCTC
24	<i>P. cordulatum</i>	PcoCT06F PcoCT06R	TGGACATCAACATGTACTGCAC ATCGGATATGGCAGAGAACC
25	<i>P. cordulatum</i>	PcoCT07F PcoCT07R	AAGCGCAGTATTGCATAGAGG TACTGCGCAACAAAGGTGAC
26	<i>P. cordulatum</i>	PcoCTT01F PcoCTT01R	AAGAGGGAGGATTAGGAGGTC ATCCACAGCCAACAACCTTC
27	<i>P. cordulatum</i>	PcoGA04F PcoGA04R	CGCTTCCGAAGAAAAGGTC GGGTGCTGTTTCCGTATTATC
28	<i>P. cordulatum</i>	PcoGA16F PcoGA16R	CTTCCAACCACATTCCTGAAG TCCTAATGTTGGAGGTTGGTG
29	<i>P. cordulatum</i>	PcoGAT01F PcoGAT01R	GGTGTATCGGGTAAAAGAATACG CCTGCTATTCAAAGTTCAAACC
30	<i>P. cordulatum</i>	PcoGT03F PcoGT03R	TGTATATTGGTGTCCGGATCG ACCCTCAAATCCCCAACC
31	<i>P. cordulatum</i>	PcoTC02F PcoTC02R	TGTCTTAACAAGCCAATGCAG CGACAGCACCCAAAATTAAC
32	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b1F Pc-b1R	CCATCACCTTTTACGGTTCC TAATTGAGGAGGGGCTCACC
33	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b2F Pc-b2R	GAGGTAACCTTTCAACTCCC ACTATAGGGCACGCGTG
34	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b3F Pc-b3R	ACAATGGATGTCCTTCTGAC AGTGACTACTATAGGGCACGC
35	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b4F Pc-b4R	TCATAGCTGTATCGTGGGCG CGCACATAGCGTACACACTC
36	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b6F Pc-b6R	TGTTATTGTGATCCGGGCAC TTGCTGATGCAATCCGACAC
37	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b7F Pc-b7R	TCGGATTGCATCAGCAAGTG TACGGTCATGCGTATCTGCT
38	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b8F Pc-b8R	AGCAGATACGCATGACCGTA CTTGCTAGTCTCGATTGCAC
39	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b11F Pc-b11R	TCAGGAAACGTATGACACGC CGATGTCGCAACGTATGATG
40	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b12F Pc-b12R	GCTGGTGCTGGTGCCCCTTA TGCTGCCGCTGCTTTTGACG
41	<i>P. polysyphonum</i>	Pc-b13F	AACGCGTTGAACGATGCATC

		Pc-b13R	CATATAGTCGTGCTGAGAGG
42	<i>P. polysiphonum</i>	Pc-b14F	CCATCACCTTTTACGGTTCC
		Pc-b14R	GGCTCACCTTGGACAAGTTT
43	<i>P. nigrum</i>	PN A5F	CTTCCAGACCAATAATCAACTT
		PN A5R	ATCCCAAATACACAACAATTC
44	<i>P. nigrum</i>	PN B5F	GTTTTGAATGGGTCCGGTGAT
		PN B5R	ATTGTTCTGATTTCTTCGTTATTG
45	<i>P. nigrum</i>	PN B9F	AGTATTGGTTGTTTCTCTC
		PN B9R	ATGTAATAATCGATAGTCCTCA
46	<i>P. nigrum</i>	PN E3F	TTTGTGTCCTCTCCCTCTCC
		PN E3R	AAGACTAAATAGGCAAGGCAAA
47	<i>P. nigrum</i>	PN F1F	ACTTCAGTGCTATTTTTATCTTCC
		PN F1R	CCAACGCCCACTCTCAT
48	<i>P. nigrum</i>	PN G11F	TTACTAGTGTCACCCCCACT
		PN G11R	TCGATGGAAAGTCACCCTCT
49	<i>P. nigrum</i>	PN H4F	CTTTTCCCACAATTCAGTCTCG
		PN H4R	ACCCATGCGTGTATCTTCTCAG
50	<i>P. nigrum</i>	PN H8aF	TGTGTCTTTTATATTTTTGATG
		PN H8aR	TATTAGTAGTTCTCCCTTTTGA
51	<i>P. nigrum</i>	PN D10F	GTGTTACCTTTGGGGCATTCA
		PN D10R	TGTGTCAGGGCATCAAACC

APÊNDICE 2. Caracteres morfológicos multicategóricos utilizados na análise de agrupamento (UPGMA) e teste de nitidez de grupos

Espécie de <i>Piper</i> / Caractere	Pilosidade do Ramo	Superfície do pecíolo	Tipo de bainha	Simetria da lâmina	Indumento da lâmina	Lâmina elíptica	Lâmina deltoide	Lamina cordifome	Lâmina ovada
<i>P. aduncum</i>	2	1	1	2	1	1	0	0	0
<i>P. amalago</i>	2	1	2	2	2	0	1	0	0
<i>P. anisum</i>	4	1	1	2	2	1	0	0	0
<i>P. arboreum</i>	1	2	2	2	2	0	0	0	0
<i>P. bicorne</i>	1	2	1	2	2	1	0	0	0
<i>P. bowiei</i>	1	2	1	2	2	1	0	0	0
<i>P. caldense</i>	1	2	1	2	2	1	0	0	0
<i>P. cernuum</i>	1	2	2	1	2	1	0	0	0
<i>P. dilatatum</i>	3	1	1	1	3	1	0	0	1
<i>P. gaudichaudianum</i>	2	1	1	1	1	1	0	0	0
<i>P. glabratum</i>	1	1	1	2	2	1	0	0	0
<i>P. hoffmannseggianum</i>	1	2	1	2	2	1	0	0	0
<i>P. macedoi</i>	2	2	1	1	2	1	0	0	0
<i>P. miquelianum</i>	2	1	1	2	4	1	0	0	1
<i>P. permucronatum</i>	1	2	1	2	2	1	0	0	0
<i>P. piliovarium</i>	1	1	1	2	2	1	0	0	0
<i>P. pubisubmarginalum</i>	1	1	1	1	2	0	0	0	0
<i>P. tuberculatum</i>	1	1	2	1	2	1	0	0	0
<i>P. umbellatum</i>	1	2	2	2	2	0	0	1	0
<i>P. vicosanum</i>	1	2	2	2	2	1	0	0	0

APÊNDICE 2. Continuação

Lâmina lanceolada	Forma da margem	Simetria da base	Forma da base	Ápice agudo	Ápice obtuso	Ápice atenuado	Ápice acuminado	Tipo de nervação	Posição da nervura	Indumento da nervura
0	2	2	1	1	0	0	1	2	2	2
0	2	1	2	0	0	1	0	1	1	1
0	2	2	3	1	0	0	1	5	2	3
1	2	2	2	1	0	0	1	2	2	4
0	2	1	4	0	0	0	1	2	2	4
1	2	1	5	1	0	0	1	2	2	4
0	2	2	5	1	0	0	0	2	2	4
0	2	2	1	1	0	0	0	2	2	4
0	2	2	5	0	0	1	0	2	1	3
0	2	2	5	1	0	0	1	2	1	2
0	2	2	5	1	0	0	1	2	2	3
0	2	1	5	1	0	0	1	4	2	4
0	2	2	5	1	0	0	1	2	2	1
0	2	2	3	0	0	1	0	5	2	1
0	1	2	5	1	0	0	0	2	2	3
0	2	2	1	1	0	0	0	2	2	4
1	2	1	3	1	0	0	0	2	2	3
1	2	2	2	1	1	0	0	2	2	4
0	2	1	1	0	0	0	1	3	2	4
0	2	2	5	1	0	0	0	2	2	4

APÊNDICE 2. Continuação

Nervura anastomosada	Núm. de espigas	Posição da espiga	Indumento do pedúnculo	Flor Pedicelada	Forma da bráctea	Estilete inconspícuo	3 estigmas	Tipo de estigma	Forma do fruto	Fruto piloso
1	1	3	3	2	2	1	1	1	2	2
1	1	1	3	2	1	1	1	2	2	2
1	1	1	3	1	1	1	2	1	3	2
2	1	1	2	2	2	1	1	4	2	2
2	1	1	2	2	2	1	2	4	3	2
2	1	1	3	2	3	2	1	1	2	2
1	1	2	2	2	2	1	1	4	2	2
1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1
2	1	3	1	2	1	1	1	4	3	1
2	1	3	3	2	2	1	1	4	1	2
2	1	3	2	2	1	1	1	4	3	2
2	1	1	2	2	2	1	2	4	3	2
1	1	1	3	2	1	1	1	4	1	2
2	1	1	3	1	1	1	2	3	1	2
1	1	1	2	2	2	1	1	4	2	2
2	1	1	2	2	2	1	2	4	2	2
2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	1
1	1	1	3	2	2	1	1	4	3	2
2	2	1	3	2	2	1	1	4	3	2
1	1	1	2	2	1	1	1	3	3	2

APÊNDICE 3. Caracteres morfológicos binários utilizados para a construção do Heat map

	Ramo Glabro	Ramo piloso	Ramo pubérulo	Ramo pubescente	Pecíolo estriado	Pecíolo canaliculado	Bainha curta	Bainha invaginante
Espécies de <i>Piper</i> /Estado de caractere	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Piper aduncum</i>	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>P. amalago</i>	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>P. anisum</i>	0	0	0	1	1	0	1	0
<i>P. arboreum</i>	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>P. bicornis</i>	1	0	0	0	0	1	1	0
<i>P. bowiei</i>	1	0	0	0	0	1	1	0
<i>P. caldense</i>	1	0	0	0	0	1	1	0
<i>P. cernuum</i>	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>P. dilatatum</i>	0	0	1	0	1	0	1	0
<i>P. gaudichaudianum</i>	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>P. glabratum</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>P. hoffmannseggianum</i>	1	0	0	0	0	1	1	0
<i>P. macedoi</i>	0	1	0	0	0	1	1	0
<i>P. miquelianum</i>	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>P. permucronatum</i>	1	0	0	0	0	1	1	0
<i>P. piliovarium</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>P. pubisubmarginalum</i>	1	0	0	0	1	0	1	0
<i>P. tuberculatum</i>	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. umbellatum</i>	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>P. vicosanum</i> Yunck.	1	0	0	0	0	1	0	1

APÊNDICE 3. Continuação

Lâmina assimétrica	Lâmina simétrica	Lâmina escabra	Lâmina glabra	Lâmina pubérula	Lâmina pilosa	Lâmina elíptica	Lâmina deltoide	Lamina cordifome	Lâmina ovada	Lâmina lanceolada	Margem repanda	Margem inteira
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1

APÊNDICE 3. Continuação

Base simétrica	Base assimétrica	Base cordada	Base arredondada	Base subcordada	Base obtusa	Base aguda	Ápice agudo	Ápice obtuso	Ápice atenuado	Ápice acuminado	Nervação acródroma
22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0

APÊNDICE 3. Continuação

Nervação campilódroma	Nervação eucamptódroma	Nervação camptódroma	Nervação broquidódroma	Nervura ereta	Nervura arqueada	Nervura pilosa	Nervura escabra	Nervura pubérula	Nervura glabra	Bordo anastomosado
34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1
0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1

APÊNDICE 3. Continuação

Espiga solitária	Espiga ereta	Espiga pêndula	Espiga curva	Pedúnculo pubérulo	Pedúnculo glabro	Pedúnculo piloso	Flor Pedicelada	Bráctea redonda	Bráctea triangular	Bráctea cuculada	Estilete inconspicuo
45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1

APÊNDICE 3. Continuação

Estilete longo	3 estigmas	Estigma ligulado	Estigma espesso	Estigma agudo	Estigma filiforme	Fruto Oblongo	Fruto globoso	Fruto anguloso	Fruto piloso
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
0	1	0	0	1	0	0	0	1	0