

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Museu Nacional – MN

Departamento de Botânica

**DIVERSIDADE DE CORPOS SILICOSOS EM GÊNEROS NEOTROPICAIS
DE PODOSTEMACEAE E IMPLICAÇÕES FILOGENÉTICAS**

Filipe Gomes Cardoso Machado da Costa



Rio de Janeiro

2014



DIVERSIDADE DE CORPOS SILICOSOS EM GÊNEROS NEOTROPICAIS DE PODOSTEMACEAE E IMPLICAÇÕES FILOGENÉTICAS

FILIPPE GOMES CARDOSO MACHADO DA COSTA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

Orientadores: Dr^a. Claudia Petean Bove

Dr^a. Denise Espellet Klein

Rio de Janeiro

Agosto de 2014

C837d Costa, Filipe Gomes Cardoso Machado da
Diversidade de corpos silicosos em gêneros
neotropicais de Podostemaceae e implicações
filogenéticas / Filipe Gomes Cardoso Machado da
Costa. -- Rio de Janeiro, 2014.
100 f.

Orientador: Claudia Petean Bove.
Coorientador: Denise Espellet Klein.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de
Pós-Graduação em Botânica, 2014.

1. Anatomia taxonômica. 2. Substâncias ergásticas. 3.
Malpighiales. I. Bove, Claudia Petean, orient.
II. Klein, Denise Espellet, coorient. III. Título.

DIVERSIDADE DE CORPOS SILICOSOS EM GÊNEROS NEOTROPICAIS DE
PODOSTEMACEAE E IMPLICAÇÕES FILOGENÉTICAS

Filipe Gomes Cardoso Machado da Costa

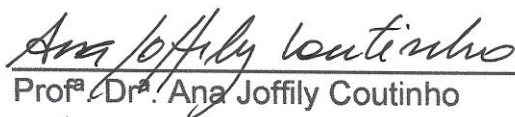
Prof^a.Dra. Claudia PeteanBove
Prof^a.Dra. Denise Espellet Klein

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

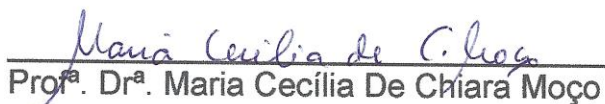
Aprovada por:



Prof^a. Dr^a. Tatiana Ungaretti PaleoKonno (Presidente)



Prof^a. Dr^a. Ana Joffily Coutinho



Prof^a. Dr^a. Maria Cecília De Chiara Moço

Prof. Dr. Ricardo Cardoso Vieira (Suplente interno)

Prof. Dr. Joecildo Francisco Rocha (Suplente externo)

Rio de Janeiro
Agosto de 2014

À todos aqueles que admiram e respeitam a natureza em todas as suas formas.

À Georgia, minha querida mãe, por sempre me encorajar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas orientadoras, Dr^a. Claudia Petean Bove e Denise Espellet Klein, pelo incentivo, dedicação e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Dr. Joecildo Francisco Rocha pela revisão desse trabalho e pelas relevantes sugestões.

À Dr^a. Andrea Ferreira da Costa, pelas sugestões no pré-projeto durante a entrevista de seleção para o mestrado.

Ao corpo docente e discente do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRJ pela proveitosa troca de conhecimento e ideias.

Ao Dr. Charles Thomas Philbrick da *Western State Connecticut University* pelo envio de materiais.

Aos colegas do Laboratório de Plantas Aquáticas (LAPLAq).

Aos funcionários do Herbário do Museu Nacional.

Ao Capes/CNPq pela bolsa concedida.

À minha família pelo apoio e incentivo, especialmente à minha mãe.

Ao meu amor, Flávia Barcelos, por sempre me estimular e tornar os momentos de trabalho mais prazerosos ainda. Não posso me furtar de expressar meus sinceros agradecimentos também à sua maravilhosa família pelos inestimáveis momentos de alegria.

Nature will bear the closest inspection; she invites us to lay our eye level with the smallest leaf, and take an insect view of its plain. She has no intertices; every part is full of life. (H. D. Thoreau, Natural History of Massachussetts, 1842)

RESUMO

DIVERSIDADE DE CORPOS SILICOSOS EM GÊNEROS NEOTROPICAIS DE PODOSTEMACEAE E IMPLICAÇÕES FILOGENÉTICAS

Filipe Gomes Cardoso Machado da Costa

Orientadores: Claudia Petean Bove
Denise Espellet Klein

Resumo da dissertação submetida ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

Podostemaceae é a mais diversa família de eudicotiledôneas estritamente aquática, estando alocada na ordem Malpighiales. Corpos silicosos estão entre as características anatômicas extensamente relatadas para a família, entretanto sua caracterização e valor taxonômico permanecem indeterminados. Esse estudo logrou investigar a importância taxonômica e filogenética dos corpos silicosos em folhas de gêneros neotropicais de Podostemaceae. Investigamos 39 espécies pertencentes a 17 gêneros, representando as principais linhagens da família. Fragmentos de folhas foram analisados em microscopia óptica e eletrônica de varredura. As histórias evolutivas dos caracteres obtidos foram traçadas na hipótese filogenética conhecida para a família. Os corpos silicosos foram encontrados em 23 espécies ocupando três regiões histológicas distintas: epiderme, subepiderme e adjacentes aos feixes vasculares, apresentando uma grande diversidade de forma (*e.g.* amorfo, retangular, lobado) e de ornamentação (*e.g.* perfurada, ondulada, crenada). A ausência de corpos silicosos é um estado apomórfico que agrupa clados intermediários na topologia da família, reaparecendo em um clado apical. Sua localização na epiderme ocorre nos clados basais, sendo sua ocorrência na subepiderme e a ornamentação verrugosa autapomorfias do gênero *Mourera*. A forma oblonga é uma autapomorfia da subfamília *Weddellinoideae*. A presença de lúmen é um estado de caráter apomórfico que ocorre nos grupos basais e no clado paleotropical de *Podostemoideae*. Os resultados obtidos corroboram a importância taxonômica e filogenética dos corpos silicosos para a família Podostemaceae.

Palavras-chave: anatomia, evolução de caracteres, fitólitos, plantas aquáticas, reófitas

ABSTRACT

DIVERSITY OF SILICA BODIES IN PODOSEMACEAN NEOTROPICAL GENERA AND ITS PHYLOGENETICS IMPLICATIONS

Filipe Gomes Cardoso Machado da Costa

Orientadores: Claudia Petean Bove
Denise Espellet Klein

Abstract of dissertation submitted to the postgraduate program in Biological Sciences (Botany), National Museum of Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ, as necessary requirements to obtain the Master's degree in Biological Sciences (Botany).

Podostemaceae is the largest eudicotyledons family of strictly aquatic plants placed in Malpighiales. Silica bodies are amid the anatomical characteristics broadly reported to the family, albeit its depiction and taxonomic value unknown. This study aimed to inspect the taxonomic and phylogenetic relevance of silica bodies in leaves of Neotropical genera of Podostemaceae. We investigated 39 species belonged to 17 genera, representing the main lineages of the family. Leaf fragments were evaluated on light and scanning electron microscopy. The characters evolution histories were traced on phylogenetic hypothesis known to the family. Silica bodies were found in 23 species on three distinct histological regions: epidermis, subepidermis, and on the boundaries of the vascular bundles, with a high diversity of shape (e.g. amorph, rectangular, lobate) and ornamentation (e.g. perforate, undulate, crenate). The absence of silica bodies is an apomorphic state which groups intermediary clades on the topology of the family, reappearing in an apical clade. Its localization on epidermis occurs in the basal clades; the occurrence on the subepidermis and the verrugose ornamentation are apomorphies of the genus *Mourera*. The oblong shape is an autapomorphy of the subfamily *Weddellinoideae*. The presence of lumen is an apomorphic character state which occurs in the basal groups and in the paleotropical clade of *Podostemoideae*. These results confirmed the taxonomic and phylogenetic importance of the silica bodies.

Keywords: anatomy, aquatic plants, characters evolution, phytoliths, reophytes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hábitos de diferentes gêneros neotropicais da família Podostemaceae.....	16
Figura 2. Primeiras ilustrações de corpos silicosos em táxons neotropicais de Podostemaceae.....	20
Figura 3. Diversidade de forma e ornamentação dos corpos silicosos em microscopia eletrônica de varredura.....	29
Figura 4. Localização dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero <i>Apinagia</i> ...	31
Figura 5. Morfologia dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero <i>Apinagia</i>	32
Figura 6. Localização e morfologia dos corpos silicosos nas folhas de espécimes dos gêneros <i>Ceratolacis</i> , <i>Cipoia</i> e <i>Diamantina</i>	34
Figura 7. Localização e morfologia dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero <i>Marathrum</i>	36
Figura 8. Localização dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero <i>Mourera</i> ...	37
Figura 9. Morfologia dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero <i>Mourera</i>	38
Figura 10. Localização e morfologia dos corpos silicosos nas folhas de espécimes dos gêneros <i>Noveloa</i> , <i>Oserya</i> e <i>Podostemum</i>	40
Figura 11. Localização e morfologia dos corpos silicosos nas folhas de espécimes dos gêneros <i>Tristicha</i> e <i>Weddellina</i>	42
Figura 12. Cladograma de consenso das filogenias propostas por Ruhfel <i>et al.</i> (2011) e Tippery <i>et al.</i> (2011) de táxons neotropicais de Podostemaceae.....	56
Figura 13. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso da evolução para a presença dos corpos silicosos.....	58
Figura 14. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso para a evolução da localização dos corpos silicosos.....	59
Figura 15. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso para a evolução da forma dos corpos silicosos.....	61
Figura 16. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso da evolução da ornamentação dos corpos silicosos.....	62
Figura 17. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso da evolução da presença do lúmen nos corpos silicosos.....	63
Figura 18. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso da evolução da forma do lúmen nos corpos silicosos.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação morfológica de corpos silicosos, adaptado de Madella (2005).....	26
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Histórico de relatos de corpos silicosos em táxons neotropicais da família Podostemaceae.....	21
Tabela 2. Lista de espécies de Podostemaceae analisadas e respectiva diversidade	23
Tabela 3. Relação de espécies de Podostemaceae neotropicais com e sem corpos silicosos.....	28
Tabela 4. Localização e morfologia dos corpos silicosos de Podostemaceae neotropical.....	43
Tabela 5. Dados morfométricos dos corpos silicosos de Podostemaceae neotropical	46
Tabela 6. Comparação intraespecífica das amostras através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis	50
Tabela 7. Lista de caracteres referentes aos corpos silicosos nas folhas de Podostemaceae e seus respectivos estados.....	53
Tabela 8. Matriz de dados para os caracteres estudados referentes aos corpos silicosos	54

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Escolha dos táxons	22
2.2. Microscopia óptica de campo claro	25
2.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	25
2.4. Mensuração dos corpos silicosos e análise estatística	27
2.5. Mapeamento dos caracteres	27
3. RESULTADOS	28
3.1. Presença de corpos silicosos.....	28
3.2. Localização e morfologia dos corpos silicosos.....	29
3.3. Análise estatística dos corpos silicosos	45
3.4. Aspectos evolutivos dos corpos silicosos.....	53
4. DISCUSSÃO.....	65
4.1. Presença-ausência de corpos silicosos	65
4.2. Localização dos corpos silicosos	66
4.3. Morfologia dos corpos silicosos.....	67
4.4. Análise estatística dos corpos silicosos	69
4.5. Evolução dos corpos silicosos.....	69
5. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
APÊNDICES	80
ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

Podostemaceae Rich. ex Kunth é a maior família de eudicotiledôneas estritamente aquática, sendo constituída por 49 gêneros e 280 espécies (COOK & RUTISHAUSER, 2007). Está alocada no clado clusióide (Malpighiales), juntamente com as famílias Bonnetiaceae (Bartl.) L. Beauvis. ex Nakai, Calophyllaceae J. Agardh, Clusiaceae Lindl. e Hypericaceae Juss. Possui ampla distribuição nas regiões tropicais, com poucos representantes nas regiões temperadas (e.g. *Podostemum ceratophyllum* Michx.). Suas espécies encontram-se restritas ao paleo- ou neotrópico, com exceção de *Tristicha trifaria* (Bory ex Willd.) Spreng. No neotrópico está representada por 20 gêneros e cerca de 150 espécies (BOVE & PHILBRICK, 2010), das quais 87 (53 endêmicas) são encontradas no Brasil (BOVE, 2014). Dados morfológicos e moleculares sustentam três subfamílias: *Tristichoideae* Engler, *Weddellinoideae* Engler e *Podostemoideae* Engler, sendo a última a mais diversa em número de espécies (ENGLER, 1930; KITA & KATO, 2001). *Tristichoideae* é irmã das demais Podostemaceae, sendo composta por quatro gêneros e cerca de 10 espécies, com um único representante no neotrópico, *Tristicha trifaria* (Bory ex Willd.). *Weddellinoideae* é monotípica (*Weddellina squamulosa* Tul.) e restrita ao neotropico. *Podostemoideae* é a subfamília de topologia mais derivada e apresenta a maior diversidade em número de espécies da família.

Os espécimes de Podostemaceae são encontrados tenazmente adpressos na superfície de substratos rochosos ou de outros substratos sólidos, submetidos à ação de corredeiras e cachoeiras (reófitas). A adesão ao substrato ocorre através de hápteros, localizados em regiões mais desenvolvidas da raiz e/ou do caule, com substâncias poliméricas adesivas secretadas por cianobactérias presentes no substrato (ANCIBOR, 1990; JÄGER-ZÜRN & GRUBERT, 2000). Os indivíduos crescem submersos durante a fase vegetativa e florescem e frutificam na temporada de estiagem, único período em que a planta encontra-se emersa. Devido à extrema adaptação ao ambiente que ocupam, os integrantes da família são dotados de características morfológicas atípicas para uma angiosperma, sendo frequentemente confundidos com algas, briófitas ou líquens na ocasião em que suas flores estejam ausentes (BELL, 1991).

A complexa disposição dos órgãos no eixo vegetativo, produto de uma intrincada ontogenia (e.g. Katayama *et al.*, 2011), emerge como um dos principais obstáculos para a interpretação morfológica de diversos integrantes da família (e.g. Rutishauser, 1997). Historicamente, as características atípicas presentes nos diversos táxons renderam à família o *status* de ordem monotípica (Podostemales; ENGLER, 1930; LINDLEY, 1833) e até mesmo de classe (Podostemopsida; CUSSET & CUSSET, 1988). Nas recentes análises filogenéticas (APG III, 2009; RUHFEL *et al.* 2011), a família aparece estreitamente relacionada à Hypericaceae, na ordem Malpighiales. As relações filogenéticas dos taxa neotropicais da família foram estudadas por Tippery *et al.* (2011), resultando em gêneros polifiléticos (*Apinagia* Tul. e *Marathrum* Humb. & Bonpl.) e a formação de um clado com grande suporte molecular (Clado J; Anexo A), constituído por espécies morfológicamente bem distintas e sem nenhuma sinapomorfia morfológica até o momento.

A morfologia da família é tida como enigmática por diversos autores, pois muitas espécies apresentam órgãos vegetativos e/ou reprodutivos originados de forma única em relação às demais angiospermas (RUTISHAUSER, 1995; RUTISHAUSER *et al.*, 2008). A raiz, quando presente, possui forma filiforme ou crustosa, podendo apresentar-se diferenciada dorsiventralmente; e geralmente apresenta atividade fotossintética. O caule frequentemente tem origem endógena na raiz e apresenta-se reduzido (Fig. 1A, B, G) ou alongado (Fig. 1C, F), simples (Fig. 1A, B, G) ou ramificado (Fig. 1C), ereto ou prostrado (Fig. 1D, E, F). As folhas são dística ou tristicamente arranjadas, podendo ser simples (Fig. 1B) ou compostas (Fig. 1A, C, E, F, G). Possuem uma grande variedade de formas: pinadas (Fig. 1F), lobadas, escamiformes; com tamanhos que variam de alguns milímetros até dois metros de comprimento (COOK & RUTISHAUSER, 2007; RUTISHAUSER, 1997). As flores são perfeitas, actino- ou zigomorfas, solitárias (Fig. 1A, D) ou em inflorescências (Fig. 1G); encontram-se protegidas por uma estrutura membranácea, a espatela, na subfamília *Podostemoideae*. O fruto é uma cápsula com superfície lisa ou dotada de costelas, com 2 ou 3 valvas iguais ou subiguais; o endoesperma está ausente (COOK & RUTISHAUSER, 2007).

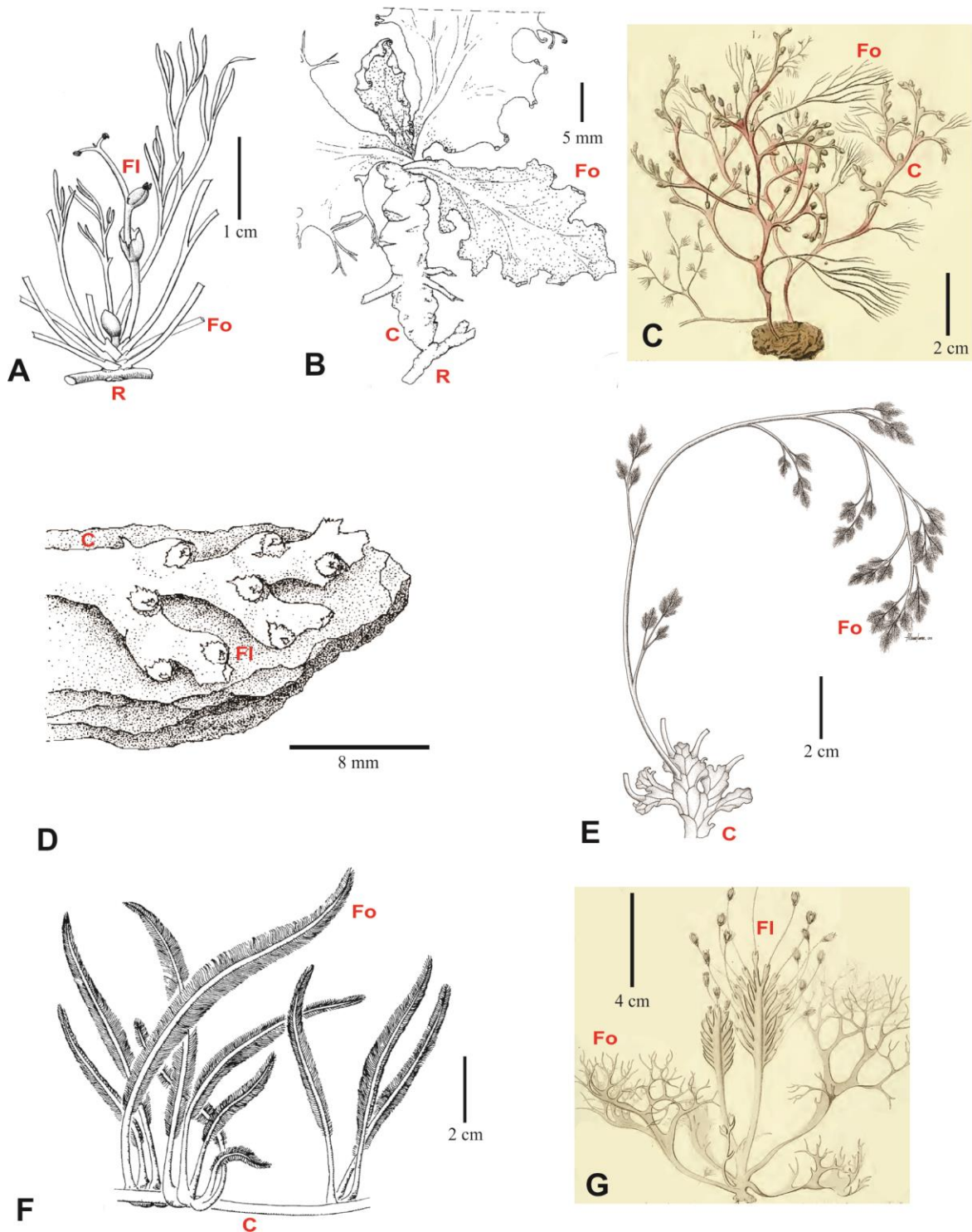


Figura 1. Hábitos de diferentes gêneros neotropicais da família Podostemaceae. A. *Ceratolacis pendunculatum* C.T. Philbrick, Novelo & Irgang. B. *Mourera aspera* (Bong.) Tul. C. *Apinagia riedelii* Tul. D. *Castelnavia noveloi* C.T. Philbrick & C.P. Bove. E. *Autana andersonii* C.T. Philbrick. F. *Marathrum plumosum* (Novelo & C.T. Philbrick) C.T. Philbrick & C.P. Bove. G. *Mourera weddelliana* Tul. Legenda: R = raiz; C = caule; Fo = folha; FI = flor/inflorescência. Adaptado de: A. Philbrick *et al.* (2004); B. Tur (1997); C, G. Tulasne (1852); D. Philbrick *et al.* (2009); E. Philbrick *et al.* (2011); F. Novelo & Philbrick (1993).

Dentre os caracteres anatômicos amplamente relatados para a família, estão a presença de corpos silicosos no tecido periférico do eixo vegetativo e nas adjacências dos feixes vasculares, feixes vasculares inconspícuos e a ausência de aerênquima; sendo este caráter incomum para plantas aquáticas (METCALFE & CHALK, 1950; SCHNELL, 1967). A epiderme dos órgãos vegetativos não apresenta cutícula visível em microscopia óptica e difere da camada de células subjacentes pelo tamanho menor de suas células e por ser dotada de cloroplastos, que podem ser dimórficos (FUJINAMI *et al.*, 2011). Os estômatos estão ausentes durante essa fase, sendo a absorção de gases necessários ao metabolismo realizada por difusão com o meio (PANNIER, 1960). Nagendran e colaboradores (1980) relatam o desenvolvimento de estômatos no tecido epidérmico de órgãos do eixo reprodutivo em *Griffithella hookeriana* (Tul.).

Diversos táxons botânicos possuem inclusões inorgânicas, como cristais de oxalato de cálcio e de sílica, que são frequentemente empregadas como caráter de valor taxonômico em diferentes níveis hierárquicos (PRYCHID & RUDALL, 1999; PRYCHID *et al.*, 2003a). O silício é absorvido na forma de ácido ortossilícico (Si(OH)_4) e acumulado na forma de corpos silicosos (ou fitólitos; $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) no meio intra ou extracelular dos órgãos vegetativos e/ou reprodutivos, (KEALHOFFER & PIPERNO, 1998; MA & YAMAJI, 2006).

A relevância da presença, localização e morfologia (forma e ornamentação) dos corpos silicosos em angiosperma, assim como a possibilidade de aplicá-los como caráter informativo em diferentes níveis taxonômicos, é ressaltada por diversos estudos (KEALHOFER & PIPERNO, 1998; PIPERNO & PEARSALL, 1998; PRYCHID *et al.*, 2003a; COSTA *et al.*, 2011), principalmente nas famílias Cyperaceae e Poaceae (CAVALCANTE, 1968; FIGUEIREDO *et al.* 1971; LU & LIU, 2003). As análises realizadas por Campos & Labouriau (1969) e Silva & Labouriau (1970) em vários gêneros de Poaceae ilustram a diversidade morfológica dos corpos silicosos e a possibilidade de emprega-lá como ferramenta taxonômica. Do ponto de vista fisiológico, o silício e seus compostos influenciam na taxa de crescimento e na captação de luz, além de fornecer resistência contra patógenos, predadores e metais pesados (EPSTEIN, 2001). De acordo com Metcalfe & Chalk (1950), os cristais de sílica em alguns gêneros de Podostemaceae seriam suficientemente numerosos, formando uma carapaça que teria a provável função de evitar o colapso

dos órgãos vegetativos durante curtos períodos de dessecação. Os corpos silicosos, assim como os grãos de pólen, possuem alta capacidade de fossilização com vantagens sobre estes, pois refletem melhor os paleoambientes locais devido à ausência de migração. Desta forma são empregados como ferramenta em diversos estudos paleobotânicos (ALEXANDRE, 1997; STRÖMBERG, 2004).

Os corpos silicosos em Podostemaceae foram primeiramente observados por Tulasne (1852), entretanto essas estruturas só foram corretamente interpretadas e ilustradas em trabalhos posteriores (CAIRO, 1881; WARMING, 1881, 1888, 1889) (Fig. 2). Desde então os corpos silicosos têm sido relatados para diversos táxons, sendo frequentemente encontrados no meio intracelular dos tecidos periféricos do eixo vegetativo (HAMMOND, 1937; KOI & KATO, 2007) e/ou reprodutivo (SÁ-HAIAD *et al.*, 2010). A relação de espécies neotropicais nas quais os corpos silicosos foram relatados encontra-se expressa na tabela 1. Grande parte dos estudos limita-se à menção de sua presença, raramente descrevendo ou comparando-os (JÄGER-ZÜRN, 2011). Em estudos recentes, Costa *et al.* (2011) concluíram que a forma e ornamentação dos corpos silicosos constituem caracteres de valor taxonômico em nível de subfamília para Podostemaceae, apontando a necessidade de investigação a fim de aferir a sua aplicabilidade em níveis hierárquicos inferiores.

Podostemaceae desempenha importante papel ecológico, pois serve como abrigo, hábitat e/ou alimento para diversos organismos aquáticos (*e.g.* Langeani & Moreira, 2013); além disso, é responsável por aumentar a heterogeneidade do ambiente através do acúmulo de sedimentos e matéria orgânica (HORVATH, 2004; SCHULZ *et al.*, 2003). A família também possui importância econômica, sendo utilizada no Panamá e na Colômbia como alimento para o gado no período de estiagem e por nativos do Amazonas como alimento sazonal (PHILBRICK & NOVELO 1995; ROYEN, 1951). Existem também relatos do uso de fragmentos de *Weddellina squamulosa* Tul. como isca de pesca e de cinzas das folhas do gênero *Rhyncholacis* Tul. para salgar alimentos (AMEKA, 2003; COSTA *et al.*, 2011). O aumento de investimentos para a construção de novas hidrelétricas e o número considerável de espécies restritas a um ou dois rios ameaçam a diversidade da família nos neotrópicos (FINER & JENKINS, 2012; PHILBRICK *et al.*, 2010).

Com base no cenário apresentado acima, a possibilidade de aplicar os corpos silicosos como carácter taxonômico e filogeneticamente informativo, assim como na reconstrução e interpretação de paleoambientes de corredeiras, emerge como elementos que motivaram o presente estudo. Nosso objetivo geral foi investigar a presença, localização e morfologia dos corpos silicosos nas folhas de táxons neotropicais da família Podostemaceae. Os objetivos específicos foram: (1) analisar possíveis variações inter e/ou intraespecíficas; (2) avaliar a potencialidade dos corpos silicosos como carácter taxonômico informativo em nível de gênero, espécie ou outros clados, (3) relacionar os resultados obtidos com as recentes filogenias, visando detectar sinapomorfias que corroborem a topologia baseada apenas em dados moleculares e (4) compreender a evolução dos caracteres analisados.

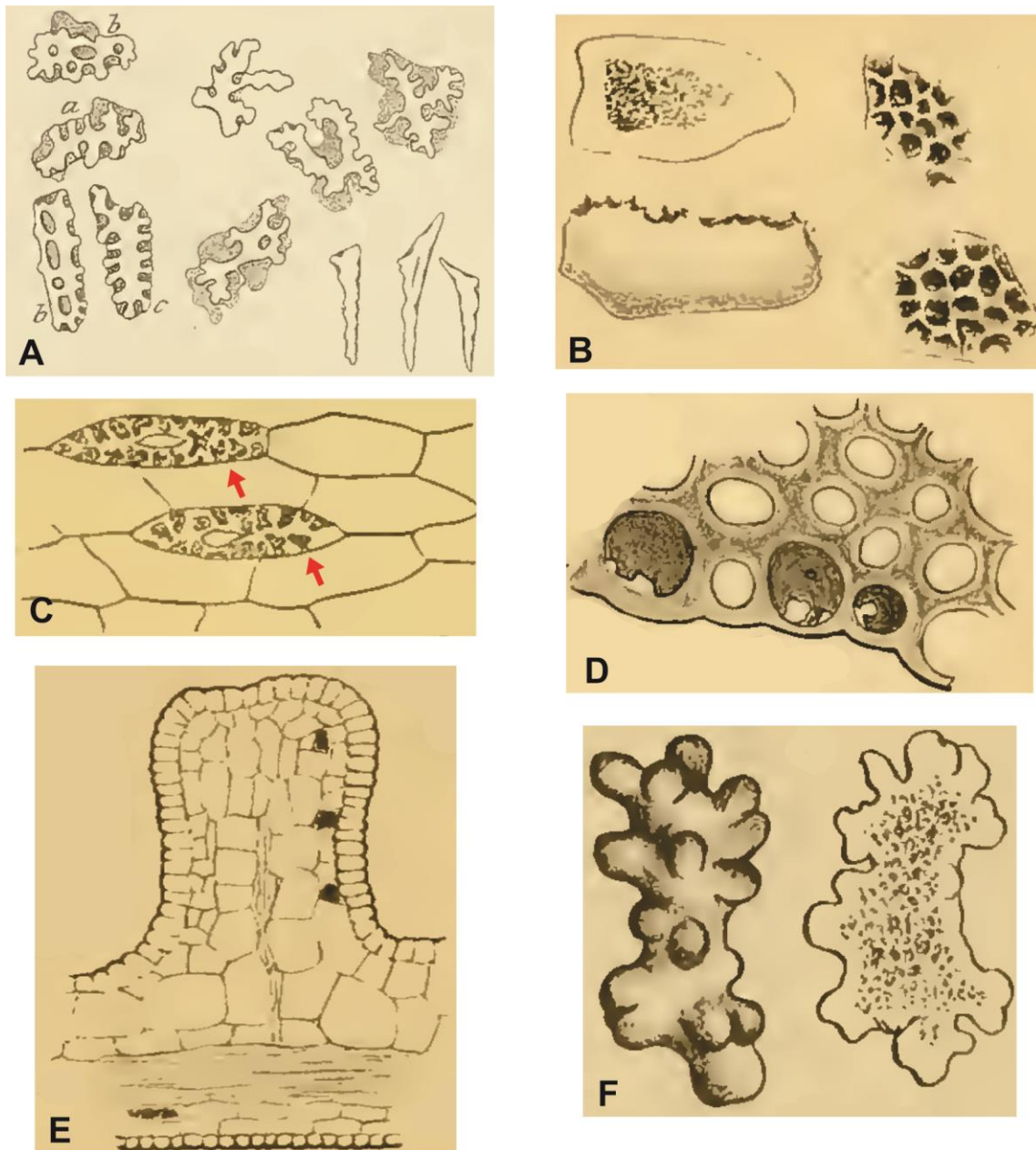


Figura 2. Primeiras ilustrações de corpos silicosos em táxons neotrópicos de Podostemaceae. A. Diversidade de formas presentes em folhas de *Tristicha trifaria* (Bory ex Willd.) Spreng. B. Corpos silicosos isolados da base das folhas de *Podostemum ovatum* C.T. Philbrick & Novelo. C. Visão paradérmica de folha de *Podostemum scaturiginum* (Mart.) C.T. Philbrick & Novelo. Setas evidenciando células com corpos silicosos. D. Seção transversal da folha de *Podostemum weddellianum* (Tul.) C.T. Philbrick & Novelo com corpos silicosos (conteúdo escuro) nas células epidérmicas. E. Seção longitudinal de uma emergência da superfície foliar de *Mourera aspera* Tul. evidenciando os corpos silicosos (conteúdo escuro) localizados nas células subepidérmicas. F. Corpos silicosos isolados do eixo vegetativo de *Podostemum muelleri* Warm. Adaptado de: A. Cairo (1881); B, D. Warming (1881); C. Warming (1899); E, F. Warming (1888).

Tabela 1. Histórico de relatos de corpos silicosos em táxons neotropicais da família Podostemaceae. Os binômios citados nas referências que foram sinonimizados encontram-se entre parênteses após o nome correto. MO: microscopia óptica de campo claro; MET: microscopia eletrônica de transmissão; MEV: microscopia eletrônica de varredura.

Autor (ano)	Taxa	Tipo de descrição
Cario (1881)	<i>Tristicha trifaria</i> (Bory ex Willd.) Spreng.	Localização, forma e ornamentação em MO
Warming (1881)	<i>Podostemum ovatum</i> C.T.Philbrick & Novelo (= <i>Mniopsis glazioviana</i>) <i>Podostemum weddellianum</i> (Tul.) C.T.Philbrick & Novelo (= <i>Mniopsis weddelliana</i>) <i>Podostemum ceratophyllum</i> Michx.	Localização, forma e ornamentação em MO
Warming (1888)	<i>Mourera aspera</i> (Bong.) Tul. <i>Podostemum muelleri</i> Warm.	Localização, forma e ornamentação em MO
Warming (1899)	<i>Podostemum distichum</i> (Cham.) Wedd. (= <i>Podostemum glaziovianum</i>) <i>Podostemum scaturiginum</i> (Mart.) C.T.Philbrick & Novelo (= <i>Mniopsis scaturiginum</i>)	Localização, forma e ornamentação em MO
Schnell (1967)	<i>Apinagia flexuosa</i> (Tul.) P.Royen <i>Apinagia richardiana</i> (Tul.) P.Royen <i>Marathrum capillaceum</i> (Pulle) P.Royen <i>Mourera fluviatilis</i> Aubl.	Localização em MO
Tur (1987)	<i>Podostemum muelleri</i> (= <i>Podostemum uruguayense</i>) <i>Tristicha trifaria</i>	Localização em MO
Ancibor (1990)	<i>Podostemum muelleri</i> (= <i>Podostemum galvone</i>) <i>Podostemum rutifolium</i> Warm. <i>Podostemum muelleri</i> (= <i>Podostemum uruguayense</i>)	Localização e forma em MO e MET

Continua.

Tabela 1. Continuação.

Autor (ano)	Taxa	Tipo de descrição
Ancibor (1990)	<i>Podostemum weddellianum</i>	Localização e forma em MO e MET
Rutishauser <i>et al.</i> (2005)	<i>Diamantina lombardii</i> Novelo, C.T. Philbrick & Irgang	Localização em MO
Koi & Kato (2007)	<i>Weddellina squamulosa</i> Tul.	Localização em MO
Sá-Haiad <i>et al.</i> (2010)	<i>Podostemum weddellianum</i>	Localização em MO
Costa <i>et al.</i> (2011)	<i>Diamantina lombardii</i> <i>Tristicha trifaria</i> <i>Weddellina squamulosa</i>	Localização, forma e ornamentação em MO e MEV

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Escolha dos táxons

A seleção dos táxons foi embasada nos terminais utilizados nas análises filogenéticas de Ruhfel *et al.* (2011) e Tippery *et al.* (2011). Foram analisados 17 gêneros e 39 espécies. São eles: *Apinagia* Tul., *Autana* C.T. Philbrick, *Castelnavia* Tul. & Wedd., *Ceratolacis* (Tul.) Wedd., *Cipoia* C.T. Philbrick, Novelo & Irgang, *Diamantina* Novelo, C.T. Philbrick & Irgang, *Jenmaniella* Engl., *Lophogyne* Tul., *Marathrum* Bonpl., *Monostylis* Tul., *Mourera* Aubl., *Noveloa* C.T. Philbrick, *Oserya* Tul. & Wedd., *Podostemum* Michx., *Rhyncholacis* Tul., *Tristicha* Thouars e

Weddellina Tul. Sempre que possível foram analisadas três espécimes por espécie, resultando em um total de 110 espécimes. A relação das espécies analisadas é apresentada na tabela 2. Os nomes dos táxons encontram-se de acordo com as mudanças nomenclaturais mais recentes sugeridas por Tippery *et al.* (2011).

Tabela 2. Lista de espécies de Podostemaceae analisadas e respectiva diversidade.

Gênero (nº de spp.)	Espécies analisadas
Tristichoideae	
<i>Tristicha</i> (6)	<i>T. trifaria</i> (Bory ex Willd.) Spreng.
Weddellinoideae	
<i>Weddellina</i> (1)	<i>W. squamulosa</i> Tul.
Podostemoideae	
<i>Apinagia</i> (51)	<i>A. corymbosa</i> (Tul.) Engl. <i>A. fimbriifolia</i> P. Royen <i>A. fluitans</i> P. Royen <i>A. longifolia</i> (Tul.) P. Royen <i>A. richardiana</i> (Tul.) P. Royen <i>A. riedelii</i> Tul. <i>A. staheliana</i> (Went.) P. Royen
<i>Autana</i> (1)	<i>A. andersonii</i> C.T. Philbrick
<i>Castelnavia</i> (6)	<i>C. fluitans</i> Tul. & Wedd. <i>C. monandra</i> Tul. & Wedd. <i>C. multipartita</i> Tul. & Wedd. <i>C. noveloii</i> C.T. Philbrick & C.P. Bove <i>C. pendulosa</i> (C.T. Philbrick & C.P. Bove) C.T. Philbrick & C.P. Bove (= <i>C. multipartita</i> f. <i>pendulosa</i>) <i>C. princeps</i> Tul. & Wedd.
<i>Ceratolacis</i> (2)	<i>C. pedunculatum</i> C.T. Philbrick, Novelo & Irgang
<i>Cipoia</i> (2)	<i>C. inserta</i> C.T. Philbrick, Novelo & Irgang <i>C. ramosa</i> C.P. Bove, C.T. Philbrick & Novelo
<i>Diamantina</i> (1)	<i>D. lombardii</i> Novelo, C.T. Philbrick & Irgang
<i>Jenmaniella</i> (7)	<i>J. ceratophylla</i> Engl. <i>J. fimbriata</i> P. Royen
<i>Lophogyne</i> (1)	<i>L. lacunosa</i> (Gardner) C.P. Bove & C.T. Philbrick

Continua.

Tabela 2. Continuação.

Gênero (nº spp.)	Espécies analisadas
<i>Marathrum</i> (10)	<i>M. aeruginosum</i> P. Royen <i>M. foeniculaceum</i> Humb. & Bonpl. <i>M. plumosum</i> (Novelo & C.T. Philbrick) C.T. Philbrick & C.P. Bove (= <i>Vanroyenella plumosa</i>) <i>M. tenue</i> Liebm. <i>M. utile</i> Tul.
<i>Monostylis</i> (1)	<i>M. capillacea</i> Tul.
<i>Mourera</i> (8)	<i>M. aspera</i> (Bong.) Tul. <i>M. elegans</i> (Tul.) Baillon (= <i>Lonchostephus elegans</i>) <i>M. fluviatilis</i> Aubl. <i>M. weddelliana</i> Tul.
<i>Noveloa</i> (2)	<i>N. coulteriana</i> (Tul.) C.T. Philbrick (= <i>Oserya coulteriana</i>)
<i>Oserya</i> (5)	<i>O. perpusilla</i> (Went.) P. Royen
<i>Podostemum</i> (11)	<i>P. ceratophyllum</i> Michx. <i>P. scaturiginum</i> (Mart.) C.T. Philbrick & Novelo
<i>Rhyncholacis</i> (22)	<i>R. applanata</i> K.I. Goebel <i>R. penicillata</i> Matthiesen

O material analisado foi obtido a partir de exsicatas e da coleção líquida do Herbário do Museu Nacional (R) e da *Western Connecticut State University* (WCSU). Sempre que possível foram analisados três exemplares de cada espécie, a fim de aferir a consistência intraespecífica da presença, morfologia e localização dos corpos silicosos. Foram utilizados, preferencialmente, os mesmos espécimes do trabalho de Tippery *et al.* (2011). A relação do material analisado encontra-se expressa no Apêndice A.

2.2. Microscopia óptica de campo claro

Para detectar a presença e examinar a morfologia dos corpos silicosos em microscopia óptica de campo claro, fragmentos de folhas foram acondicionados em solução (1:1) de peróxido de hidrogênio a 20 volumes e ácido acético glacial (FRANKLIN, 1945) por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram maceradas na presença de óleo de cravo e cristais de fenol aquecidos (JOHANSEN, 1940).

A localização dos corpos silicosos na lâmina foliar foi determinada através de seções anatômicas transversais e longitudinais dos terços inferior, médio e superior. Fragmentos de material, pertencentes a amostras fixadas em FAA₇₀ (JOHANSEN, 1940) e conservadas em etanol 70%, foram: desidratados em série etílica crescente; incluídos em resina metacrilato (GERRITS & SMID, 1983), Historesin[®], Leica; e posteriormente seccionados, com lâmina de aço, em micrótomo rotativo Kedee modelo KD-3358 a 5 µm. Os cortes obtidos foram corados em solução aquosa de azul de toluidina O a 0,05% (O'BRIEN *et al.*, 1965), por cerca de 30 segundos, e montados em bálsamo do Canadá. O protocolo utilizado para o emblocamento das amostras encontra-se no Apêndice B.












A terminologia utilizada para a descrição da forma e ornamentação dos cristais de sílica está de acordo com Madella *et al.* (2005), com adaptações (Quadro 1).

2.3. Microscopia eletrônica de varredura

A fim de apartar os corpos silicosos da matéria orgânica, permitindo a análise adequada da forma e da ornamentação em microscopia eletrônica de varredura, fragmentos foliares foram, de forma inédita, acetolisados. Para tal, os autores deste trabalho realizaram adaptações na metodologia estabelecida por Erdtman (1952). O artigo elaborado para a divulgação desta nova metodologia e utilização da acetólise foi submetido para publicação na *Review of Paleobotany and Palynology* (Apêndice C).

Após acetolisadas, as amostras foram acondicionadas em álcool etílico e dispersas em suportes de alumínio. Posteriormente o material foi metalizado e analisado em microscópio eletrônico de varredura (sob aceleração de 15 kV) modelo JEOL JSM 6390 LV do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Invertebrados do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Quadro 1. Classificação morfológica de corpos silicosos, adaptado de Madella (2005)

Forma		Oblongo
		Curto-retangular
		Retangular
		Poliédrico
		Lobado
Superfície		Crenada
		Ondulada
		Granulosa
		Perfurada
		Verrugosa
		Lisa

2.4. Mensuração dos corpos silicosos e análise estatística

Para o estudo morfométrico, 20 corpos silicosos isolados, obtidos do método de maceração, foram fotomicrografados em microscopia óptica de campo claro. O comprimento e a largura destes foram mensurados aleatoriamente com o auxílio do *software* Meazure versão 2.0.158 (ROBERTS, 2004). Em seguida foram calculadas a média aritmética (\bar{x}), o desvio padrão (s) e o intervalo de confiança a 95% (I.C. $\alpha = 0,05$). Com a finalidade de verificar a normalidade das amostras aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO & WILK, 1965). Os dados morfométricos dos diferentes espécimes de cada espécie foram comparados entre si utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KRUSKAL & WALLIS, 1952), a fim de evidenciar possíveis diferenças intraespecíficas. As análises estatísticas descritas acima foram conduzidas no sistema Action versão 2.6.216.366 (ACTION, 2013)

2.5. Mapeamento dos caracteres

Os resultados referentes à presença, localização e morfologia dos corpos silicosos foram contextualizados nas hipóteses das relações filogenéticas para os taxa neotropicais propostas por Ruhfel *et al.* (2011) e Tippery *et al.* (2011). A fim de traçar a evolução os estados dos caracteres obtidos, uma árvore de consenso das filogenias foi confeccionada no *software* Mesquite versão 2.75 (MADDISON & MADDISON, 2011). A construção dos caracteres e seus estados foi realizada seguindo as recomendações de Sereno (2007).

3. RESULTADOS

3.1. Presença de corpos silicosos

Os corpos silicosos foram detectados em folhas de 23 espécies, estando ausentes em 16. A condição de presença ou ausência dessas estruturas foi constante nos espécimes de cada táxon estudado (Tab. 3).

Tabela 3. Relação de espécies de Podostemaceae neotropicais com e sem corpos silicosos.

Espécies com corpos silicosos	Espécies sem corpos silicosos
<i>Apinagia fluitans</i>	<i>Apinagia corymbosa</i>
<i>Apinagia longifolia</i>	<i>Apinagia fimbriifolia</i>
<i>Apinagia richardiana</i>	<i>Autana andersonii</i>
<i>Apinagia riedelii</i>	<i>Castelnavia fluitans</i>
<i>Apinagia staheliana</i>	<i>Castelnavia monandra</i>
<i>Ceratolacis pedunculatum</i>	<i>Castelnavia multipartita</i>
<i>Cipoia inserta</i>	<i>Castelnavia noveloi</i>
<i>Cipoia ramosa</i>	<i>Castelnavia pendulosa</i>
<i>Diamantina lombardii</i>	<i>Castelnavia princeps</i>
<i>Marathrum foeniculaceum</i>	<i>Jenmaniella ceratophylla</i>
<i>Marathrum plumosum</i>	<i>Jenmaniella fimbriata</i>
<i>Marathrum tenue</i>	<i>Lophogyne lacunosa</i>
<i>Marathrum utile</i>	<i>Marathrum aeruginosum</i>
<i>Mourera aspera</i>	<i>Monostylis capillacea</i>
<i>Mourera elegans</i>	<i>Rhyncholacis applanata</i>
<i>Mourera fluviatilis</i>	<i>Rhyncholacis penicillata</i>
<i>Mourera weddelliana</i>	

Continua.

Tabela 3. Continuação.

Espécies com corpos silicosos	Espécies sem corpos silicosos
<i>Noveloa coulteriana</i>	
<i>Oserya perpusilla</i>	
<i>Podostemum ceratophyllum</i>	
<i>Podostemum scaturiginum</i>	
<i>Tristicha trifaria</i>	
<i>Weddellina squamulosa</i>	

3.2. Localização e morfologia dos corpos silicosos

Os corpos silicosos foram encontrados preenchendo quase totalmente o volume do protoplasto. Essas estruturas assumem o mesmo formato das células nas quais são depositadas. Foi encontrada uma diversidade de forma e superfície dos fitólitos, como ilustrado na figura 3. Adicionalmente, estas estruturas forma encontradas em três regiões histológicas da folha: epiderme, subepiderme e nas células adjacentes aos feixes vasculares. As descrições para cada gênero e espécie seguem abaixo.

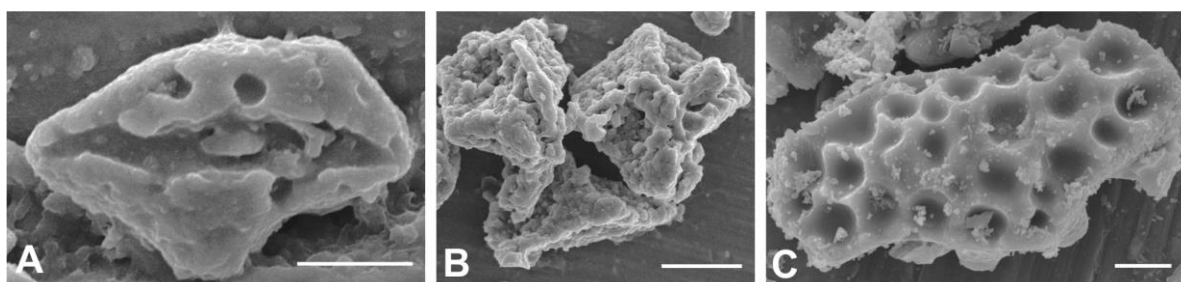


Figura 3. Diversidade de forma e ornamentação dos corpos silicosos em microscopia eletrônica de varredura. A. *Cipoia ramosa*. Poliédrico com superfície perfurada e um lúmen paralelo ao maior eixo. B. *Mourera fluviatilis*. Amorfos com superfície verrugosa. C. *Weddellina squamulosa*. Oblongos com superfície ondulada. Barra: A= 10 μ m; B-C.= 20 μ m

3.2.1. *Apinagia* (Fig. 3A-D; Fig. 4A-L; Tab. 4)

Apinagia fluitans (Fig. 4A, B)

Apinagia longifolia (Fig. 3A, B; Fig. 4C-E)

Apinagia richardiana (Fig. 3C; Fig. 4F-H)

Apinagia riedelii (Fig. 4I-J)

Apinagia staheliana (Fig. 3D; Fig. 4K, L)

Os corpos silicosos foram localizados em células adjacentes aos feixes vasculares por toda a extensão da folha. *Apinagia longifolia* apresentou essas estruturas também em células do estrato subepidérmico de ambas as faces, por toda a extensão da folha. Apresentaram forma retangular, sendo que em *Apinagia longifolia* pode mostrar-se também curto-retangular; com superfície densamente granulosa, sendo que em *A. richardiana* e *A. riedelii* apresentaram corpos silicosos com superfície esparsa e densamente granulosa no mesmo espécime; lúmen ausente.

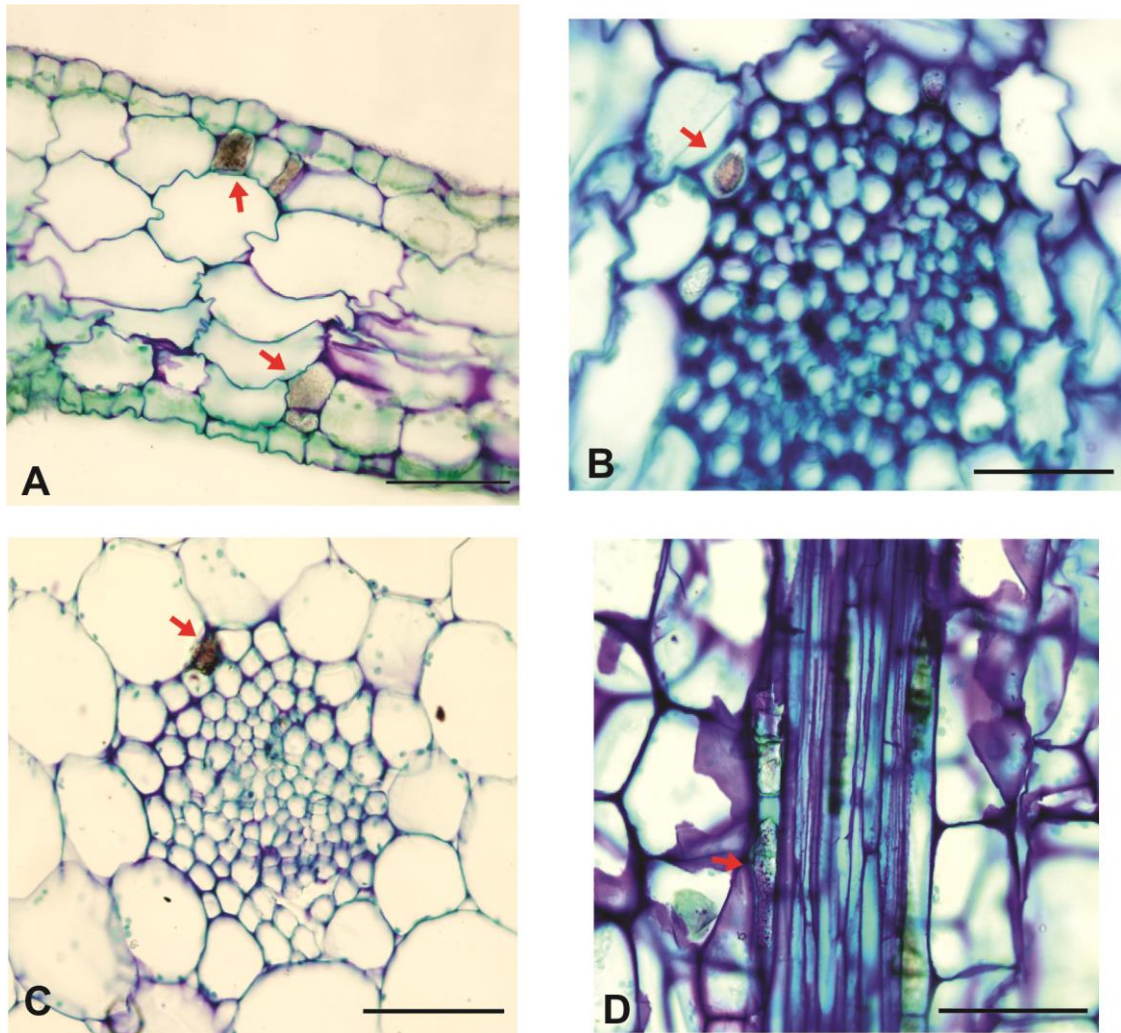


Figura 4. Localização dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero *Apinagia*. A, B. *Apinagia longifolia*. Seções transversais do terço médio com corpos silicosos (setas) nas células subepidérmicas (A) e nas adjacentes aos feixes vasculares (B). C. *Apinagia richardiana*. Seção transversal do terço superior com corpos silicosos (setas) nas células adjacentes ao feixe vascular. D. *Apinagia staheliana*. Seção longitudinal do terço médio com corpos silicosos adjacentes ao feixe vascular. Barra: A, B, D.= 100 μ m; C.= 50 μ m. Voucher: A, B. C.P. Bove et al. 1975; C. C.P. Bove et al. 1972; D. C.P. Bove et al. 1869.

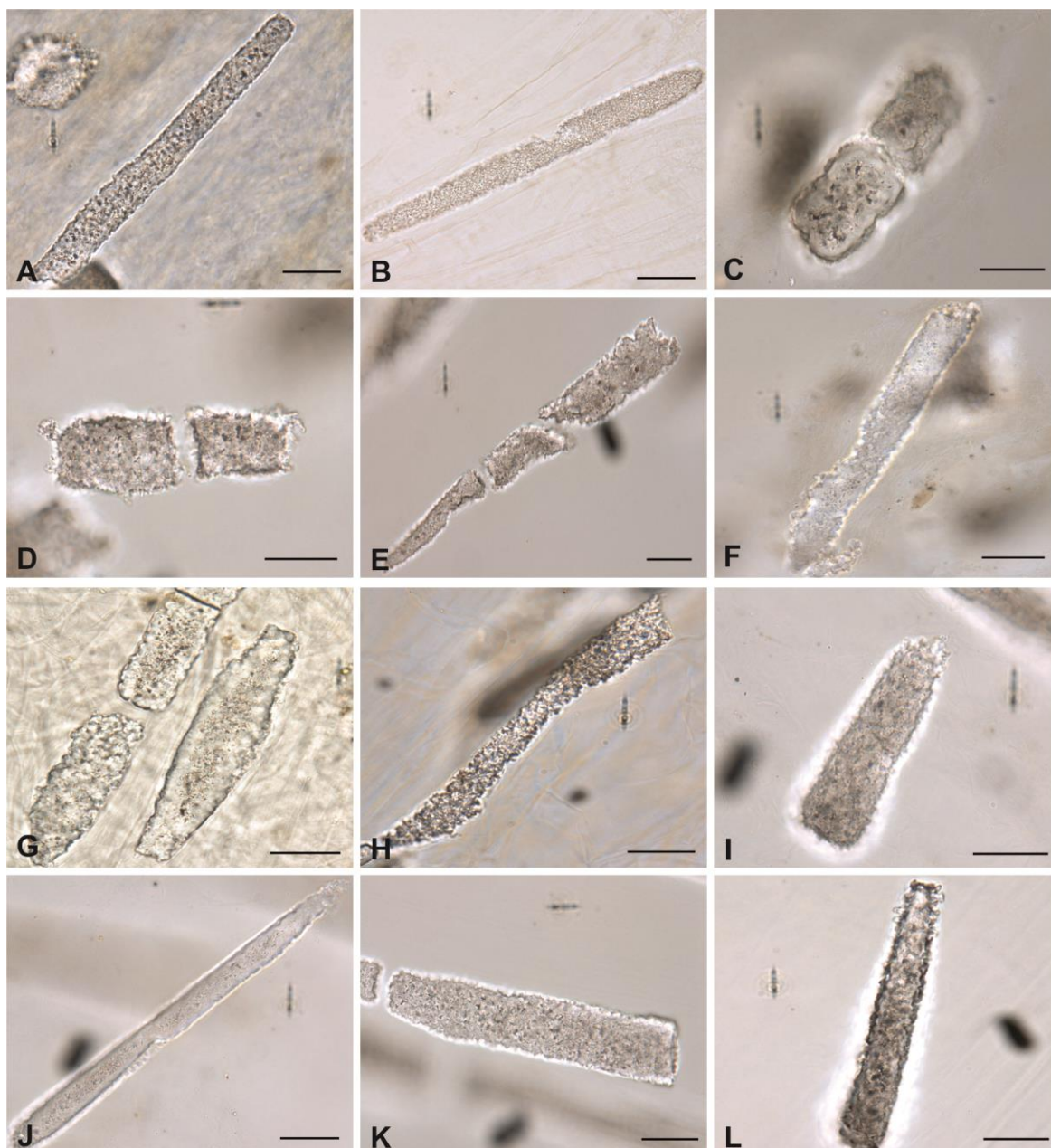


Figura 5. Morfologia dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero *Apinagia*. A, B. *Apinagia fluitans*. Retangulares com superfície densamente granulosa. C-E. *Apinagia longifolia* – C, D. Curto retangulares com superfície esparsa (C) e densamente (D) granulosa; E. Retangulares com superfície densamente granulosa. F-H. *Apinagia richardiana*. Retangulares com superfície esparsa (F, G) e densamente granulosa (H). I, J. *Apinagia riedelii*. Retangulares com superfície esparsa (I) e densamente (J) granulosa. K, L. *Apinagia staheliana*. Retangulares com superfície densamente granulosa. Barra: 20 μ m. Voucher: A, B. C.P. Bove et al. 1896; C. C.P. Bove et al. 1943; D, E. C.P. Bove et al. 1950; F. C.P. Bove et al. 1945; G. C.P. Bove et al. 1972; H. C.P. Bove et al. 2355; I, J. C.P. Bove et al. 2134; K, L. C.P. Bove et al. 1869.

3.2.2. *Ceratolacis*

Ceratolacis pedunculatum (Fig. 5D, E; Tab. 4)

Os corpos silicosos foram localizados em células epidérmicas de ambas as faces do terço inferior foliar; raros ou ausentes nos terços médio e superior. Apresentaram forma retangular e poliédrica, com superfície lisa e lúmen alongado paralelo ao maior eixo.

3.2.3. *Cipoia* (Fig. 5A, B, F-J; Tab. 4)

Cipoia inserta (Fig. 5F, G)

Cipoia ramosa (Fig. 5H-J)

Os corpos silicosos foram localizados nas células epidérmicas de ambas as faces, por toda a extensão da folha. Apresentaram forma retangular e poliédrica, com superfície perfurada e lúmen amorfo.

3.2.4. *Diamantina*

Diamantina lombardii (Fig. 5C, K, L; Tab. 4)

Os corpos silicosos foram localizados nas células epidérmicas de ambas as faces, por toda a extensão da folha. Apresentaram forma retangular e poliédrica, com superfície perfurada e lúmen circular.

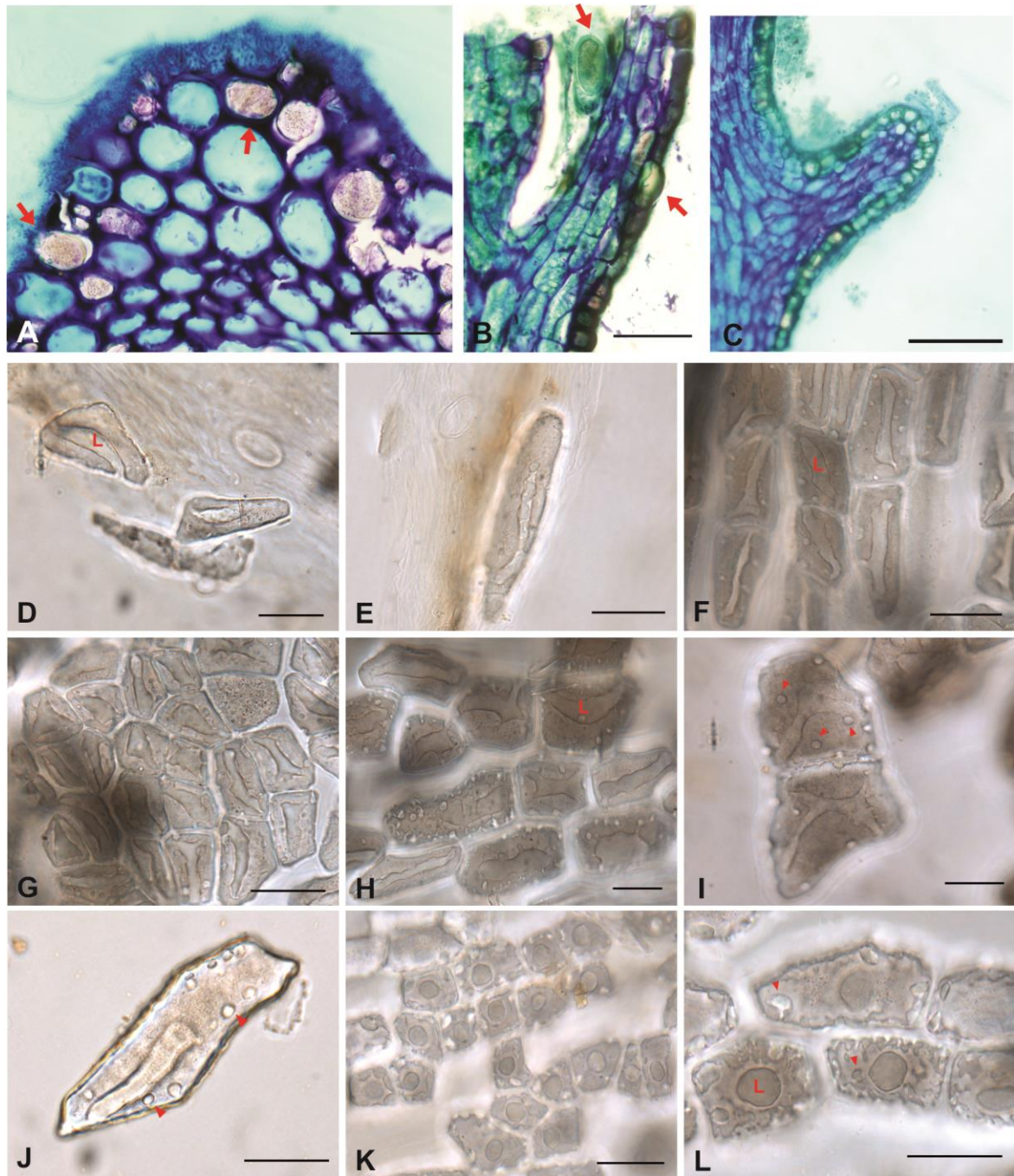


Figura 6. Localização (A-C) e morfologia (D-L) dos corpos silicosos nas folhas de espécimes dos gêneros *Ceratolacis*, *Cipoia* e *Diamantina*. A. *Cipoia inserta*. Seção transversal do terço médio evidenciando a presença de corpos silicosos (setas) nas células epidérmicas. B. *Cipoia ramosa*. Seção longitudinal do terço médio evidenciando corpos silicosos nas células epidérmicas. C. *Diamantina lombardii*. Seção longitudinal do terço médio evidenciando corpos silicosos nas células epidérmicas. D, E. *Ceratolacis pedunculatum*. Poliédricos (D) e retangular (E) com superfície lisa e lúmen alongado paralelo ao maior eixo. F, G. *Cipoia inserta*. Retangulares (F) e poliédricos (G) com superfície perfurada e lúmen amorfo. H-J. *Cipoia ramosa*. Retangulares (H, J) e poliédricos (I) com superfície perfurada e lúmen amorfo. K, L. *Diamantina lombardii*. Poliédricos (K) e retangulares (L) com superfície perfurada e lúmen circular. Barra: A-C.= 100 μ m; D-L.= 20 μ m. Legenda: L= lúmen; cabeça de seta= perfurações. Voucher: A. C.P. Bove et al. 2317; B. C.P. Bove et al. 2251; C. C.P. Bove et al. 2131; D. C.P. Bove et al. 2334; E. C.P. Bove et al. 2336; F. C.P. Bove et al. 2374; G. C.P. Bove et al. 2205; H, J. C.P. Bove et al. 2299; I. C.P. Bove et al. 2251; K. C.P. Bove et al. 2201; L. C.P. Bove et al. 2131.

3.2.5. *Marathrum* (Fig. 6A-I; Tab. 4)

Marathrum foeniculaceum (Fig. 6A, D-F)

Marathrum plumosum (Fig. 6G-I)

Marathrum tenue

Marathrum utile

Os corpos silicosos foram localizados em células do estrato subepidérmico de ambas as faces e nas células adjacentes aos feixes vasculares, por toda a extensão da folha. Apresentaram forma curto-retangular ou retangular, com superfície esparsamente granulosa em *Marathrum foeniculaceum*, densamente granulosa em *M. plumosum* e esparsa ou densamente granulosa em *M. tenue* e *M. utile*; lúmen ausente.

3.2.6. *Mourera* (Fig. 7A-E; Fig. 8A-L; Tab. 4)

Mourera aspera (Fig. 7A, B; Fig. 8A-D)

Mourera elegans (Fig. 7C; Fig. 8E-H)

Mourera fluviatilis (Fig. 7D, E; Fig. 8I, J)

Mourera weddelliana (Fig. 8K, L)

Os corpos silicosos foram localizados em células do estrato subepidérmico de ambas as faces, por toda a extensão da folha. Em *Mourera aspera* e *M. fluviatilis* ocorrem também em células adjacentes aos feixes vasculares. Apresentaram forma retangular ou amorfa, sendo somente amorfa em *M. fluviatilis*, com superfície densamente verrugosa em *M. fluviatilis* e *M. weddelliana* e esparsa a densamente verrugosa em *M. aspera* e *M. elegans*; lúmen ausente.

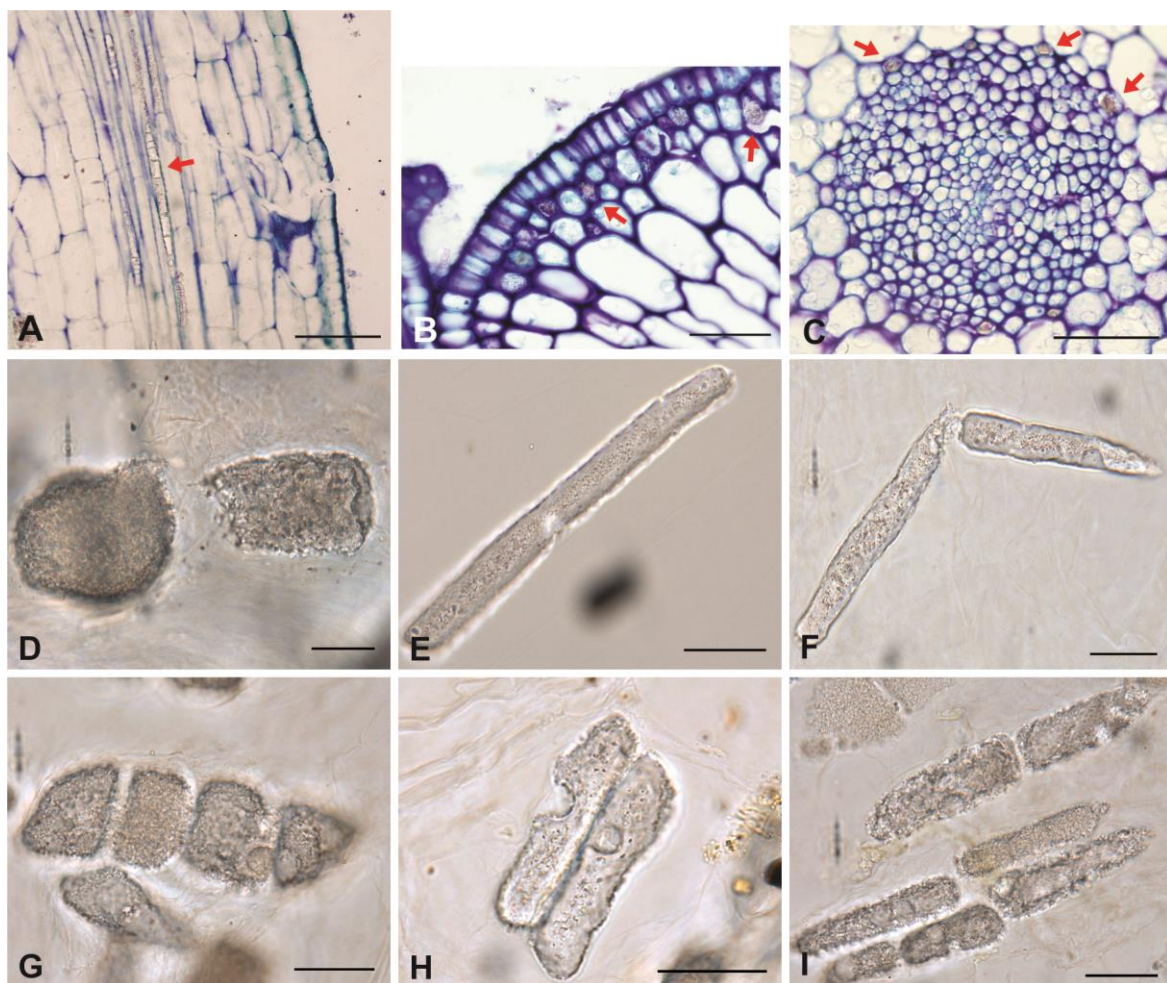


Figura 7. Localização (A-C) e morfologia (D-I) dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero *Marathrum*. A. *Marathrum foeniculaceum*. Seção longitudinal do terço médio evidenciando corpos silicosos (seta) nas células adjacentes ao feixe vascular. B, C. *Marathrum plumosum*. Seções transversais do terço apical evidenciando corpos silicosos (setas) nas células do estrato subepidérmico (B) e nas adjacentes aos feixes vasculares (C). D-F. *Marathrum foeniculaceum* – D. Curto-retangulares com superfície esparsamente granulosa; E, F. Retangulares com superfície esparsamente granulosa. G-I. *Marathrum plumosum* – G. Curto-retangulares com superfície densamente granulosa; H, I. Retangulares com superfície densamente granulosa. Barra: A.= 150 μ m; B.= 50 μ m; C.= 100 μ m; D-I.= 20 μ m. Voucher: A, F. C.P. Bove et al. 1630; B, C, G-I. C.P. Bove et al. 1629; D, E. C.P. Bove et al. 1627.

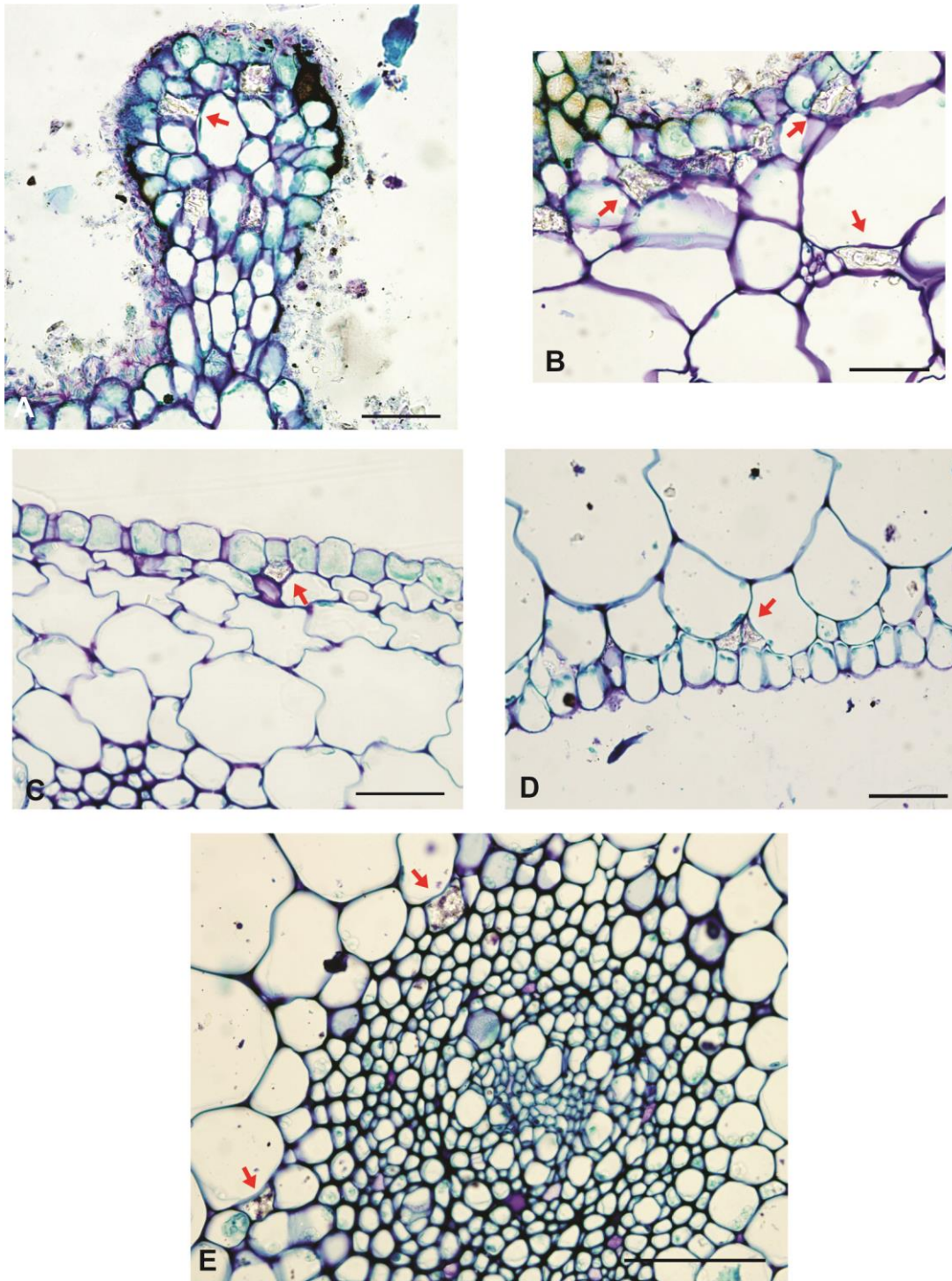


Figura 8. Localização dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero *Mourera*. A, B. *Mourera aspera* – A. Seção longitudinal de uma emergência foliar do terço médio evidenciando corpos silicosos (seta); B. Seção transversal do terço médio evidenciando corpos silicosos (setas) nas células do estrato subepidérmico da face adaxial e nas adjacentes aos feixes vasculares. C. *Mourera elegans*. Seção transversal do terço superior evidenciando corpo silicoso (seta) em célula subepidérmica da face adaxial. D, E. *Mourera fluviatilis*. Seções transversais do terço médio evidenciando corpos silicosos (setas) nas células subepidérmicas da face abaxial (D) e nas adjacentes ao feixe vascular (E). Barra: A-C, E.= 50 μ m; D= 100 μ m. Voucher: A, B. C.P. Bove et al. 1080; C, D. C.P. Bove et al. 1899; E. C.P. Bove et al. 1944.

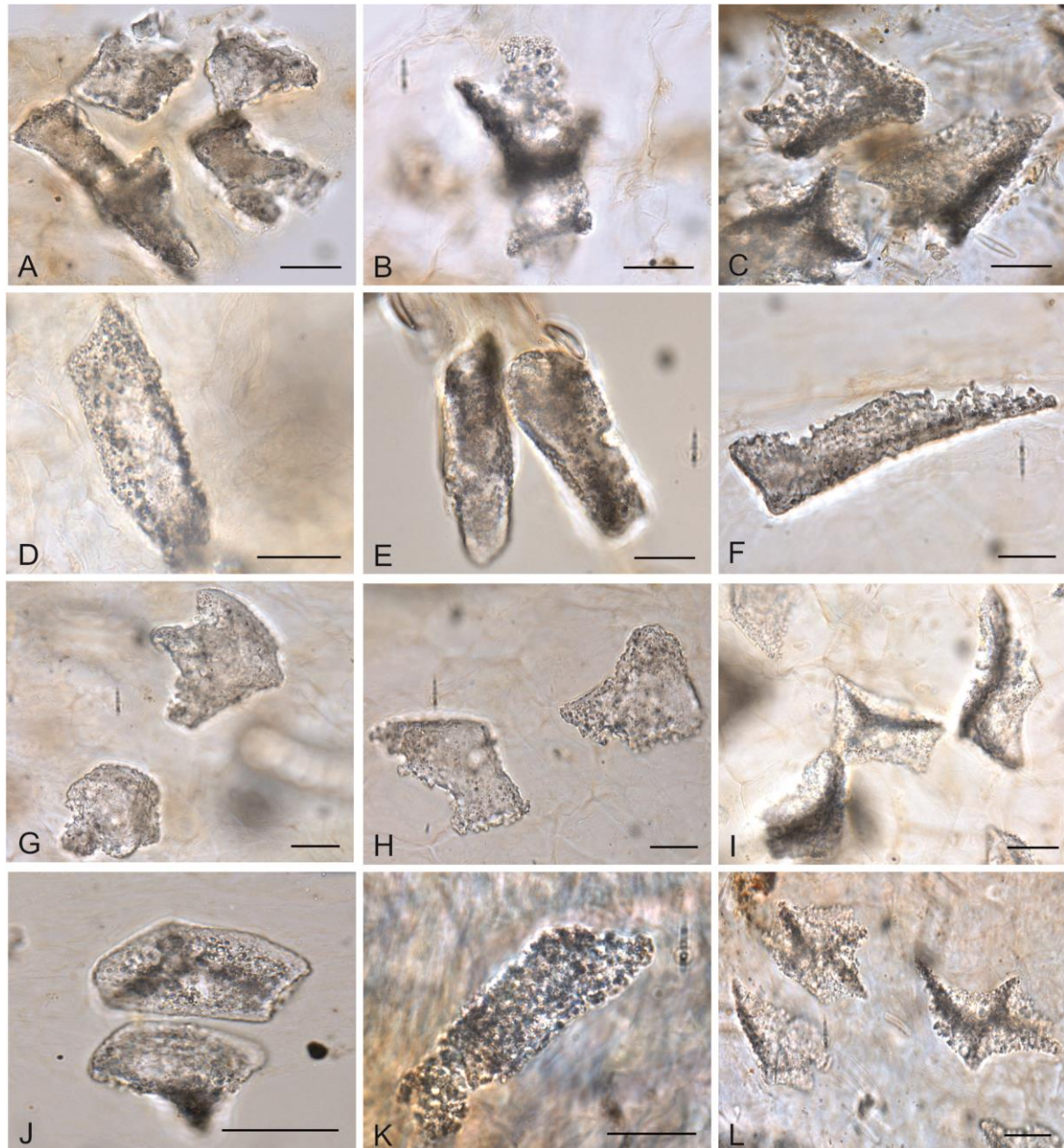


Figura 9. Morfologia dos corpos silicosos nas folhas de espécimes do gênero *Mourera*. A-D. *Mourera aspera* – A-C. Amorfos com superfície esparsa (A) e densamente (B, C) verrugosa; D. Retangular com superfície esparsamente verrugosa. . E-H. *Mourera elegans* – E, F: Retangulares com superfície esparsa (E) e densamente (F) verrugosa; G, H: Amorfos com superfície esparsamente verrugosa. I, J. *Mourera fluviatilis*. Amorfos com superfície densamente verrugosa. K, L. *Mourera weddelliana*. Retangular (K) e amorfos (L) com superfície densamente verrugosa. Barra: 20 μ m. Voucher: A. C.P. Bove et al. 1343; B, D. C.P. Bove et al. 1080; C. C.P. Bove et al. 2304; E. C.P. Bove et al. 1899; F-H. C.P. Bove et al. 1713; I. C.P. Bove et al. 1944; J. C.P. Bove et al. 2285; K. C.P. Bove et al. 1738; L. C.P. Bove et al. 2297.

3.2.7. *Noveloa* (Fig. 9A, D, E; Tab. 4)

Noveloa coulteriana

Os corpos silicosos foram localizados em células do estrato subepidérmico de ambas as faces e nas células adjacentes aos feixes vasculares, por toda a extensão da folha. Apresentaram forma retangular e superfície lisa; lúmen ausente.

3.2.8. *Oserya* (Fig. 9B, F, G; Tab. 4)

Oserya perpusilla

Os corpos silicosos foram localizados em células do estrato subepidérmico de ambas as faces, por toda a extensão da folha. Apresentaram forma retangular e superfície densamente granulosa; lúmen ausente.

3.2.9. *Podostemum* (Fig. 9I-L; Tab. 4)

Podostemum ceratophyllum (Fig. 9I, J)

Podostemum scaturiginum (Fig. 9K, L)

Os corpos silicosos foram localizados nas células epidérmicas de ambas as faces, por toda a extensão da folha. Apresentaram forma retangular ou poliédrica, com superfície lisa em *Podostemum ceratophyllum* e ondulada em *P. scaturiginum*; com lúmen alongado paralelo ao maior eixo.

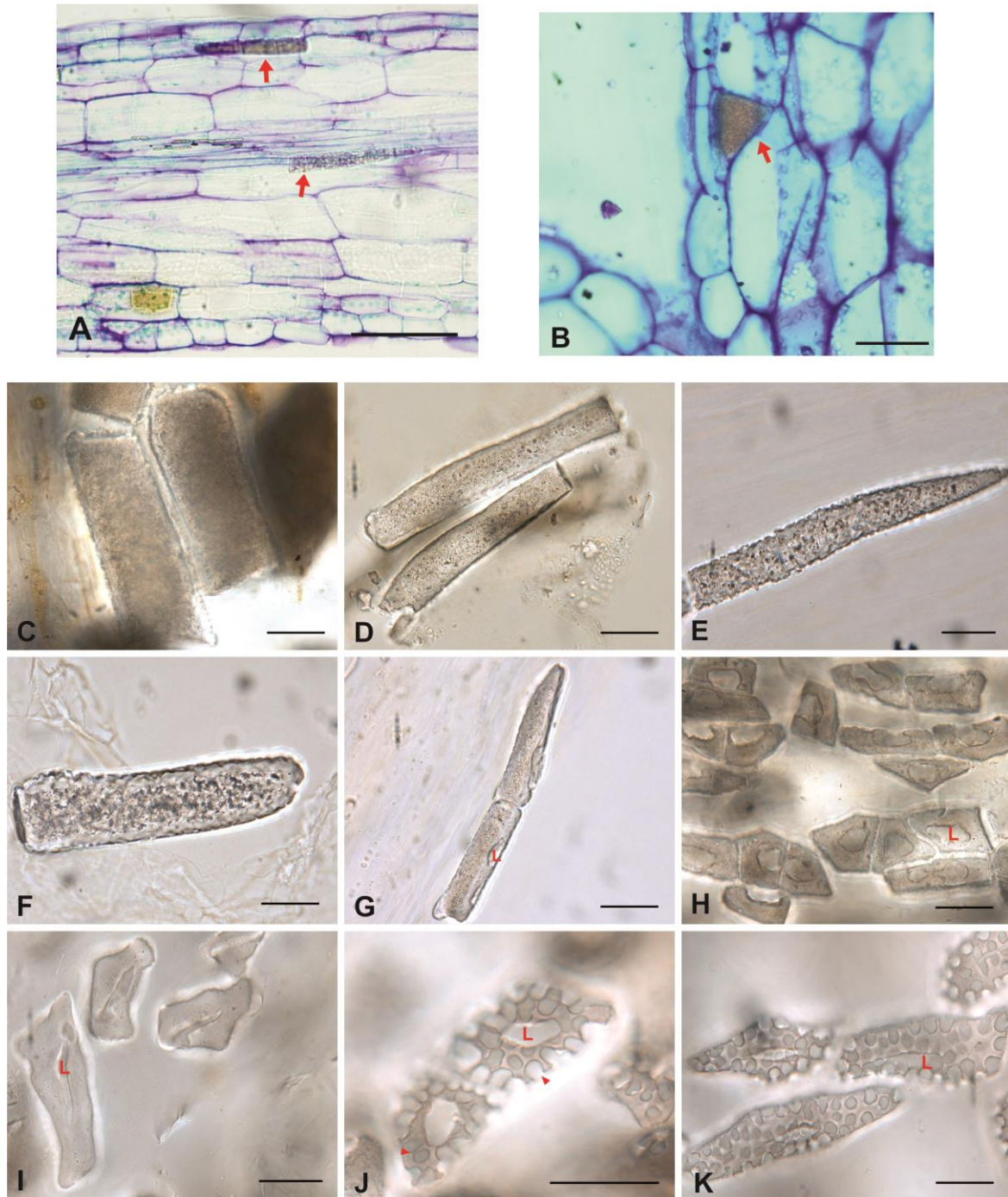


Figura 10. Localização (A, B) e morfologia (C-K) dos corpos silicosos nas folhas de espécimes dos gêneros *Noveloa*, *Oserya* e *Podostemum*. A. *Noveloa coulteriana*. Seção longitudinal do terço médio evidenciando corpos silicosos (setas) nas células subepidérmicas e nas adjacentes ao feixe vascular. B. *Oserya perpusilla*. Seção longitudinal do terço médio evidenciando corpo silicoso (seta) em célula subepidérmica. C, D. *Noveloa coulteriana*. Retangulares com superfície lisa. E, F. *Oserya perpusilla*. Retangulares com superfície densamente granulosa. G-I. *Podostemum ceratophyllum*. Retangulares (G) e poliédricos (H, I) com superfície lisa dotada de lúmen alongado. J, K. *Podostemum scaturiginum*. Poliédricos (J) e retangulares (K) com superfície ondulada e lúmen alongado. Barra: A-B.= 50 μ m; C-K.= 20 μ m. Legenda: L= lúmen; cabeça de seta= depressões. Voucher: A. C.P. Bove et al. 1631; B. C.P. Bove et al. 1956; C. C.P. Bove et al. 1634; D. C.P. Bove et al. 1631; E-F. C.P. Bove et al. 1946; G, H. C.T. Philbrick et al. 4639; I. C.T. Philbrick et al. 4634; K. C.P. Bove et al. 2245; K. C.P. Bove et al. 1030.

3.2.10. *Tristicha* (Fig. 10A, C, D; Tab. 4)

Tristicha trifaria

Os corpos silicosos foram localizados nas células epidérmicas de ambas as faces, por toda a extensão da folha. Apresentaram forma lobada (em formato de “H”), nas células epidérmicas da região da nervura central, ou retangular nas demais, com superfície crenada; lúmen ausente.

3.2.11. *Weddellina* (Fig. 10B, E, F; Tab. 4)

Weddellina squamulosa

Essa espécie apresenta dois tipos de folhas: as filamentosas e as escamiformes. Os corpos silicosos foram localizados somente nas células epidérmicas da face abaxial das folhas escamiformes, por toda a extensão. Apresentaram forma oblonga e superfície ondulada; lúmen ausente.

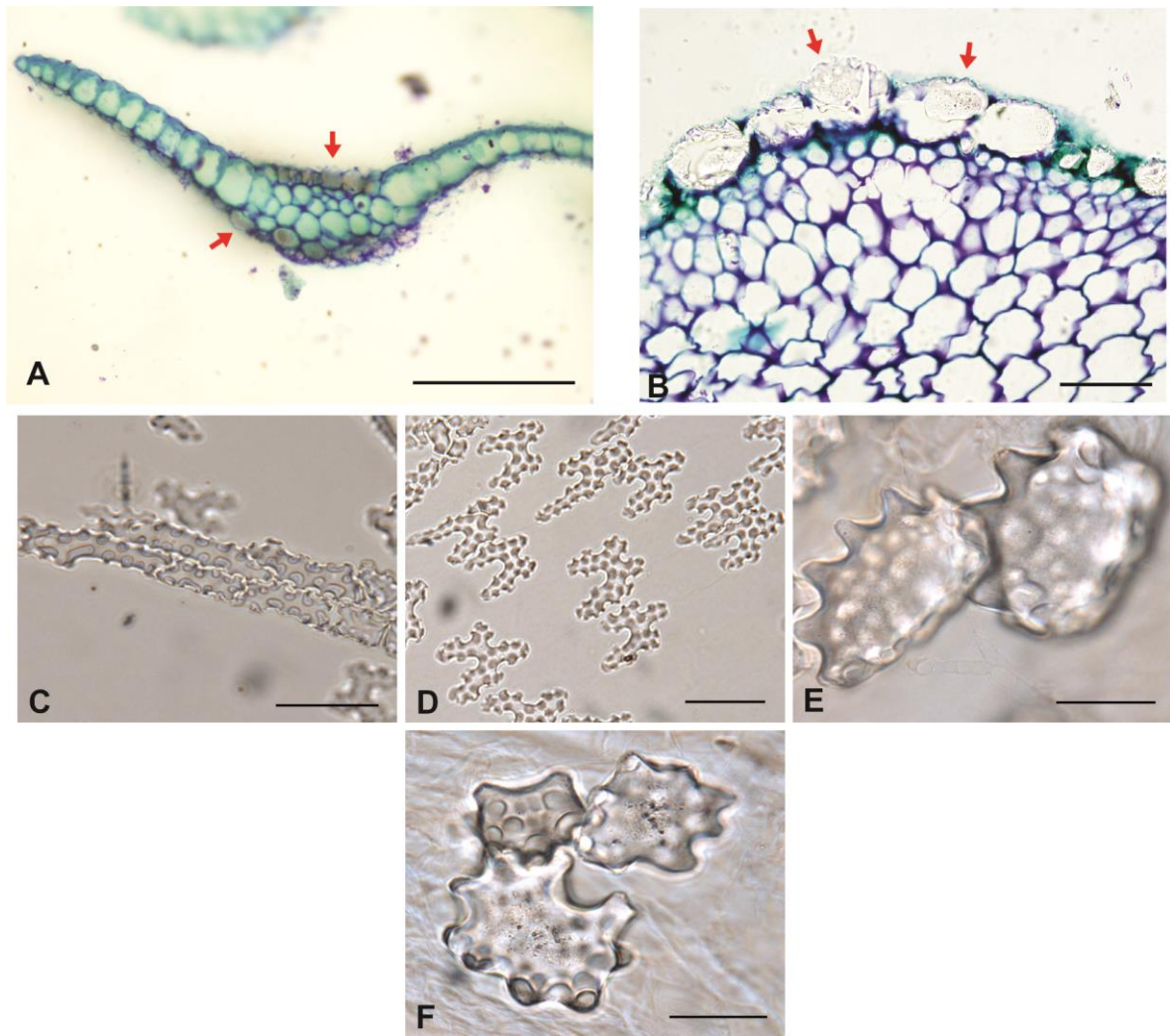


Figura 11. Localização (A, B) e morfologia dos corpos silicosos (C-F) nas folhas de espécimes dos gêneros *Tristicha* e *Weddellina*. A. *Tristicha trifaria*. Seção transversal do terço médio. B. *Weddellina squamulosa*. Seção transversal do terço médio de folha escamiforme com setas evidenciando corpos silicosos nas células epidérmicas. C, D. *Tristicha trifaria*. Retangulares (C) e lobados (D) com superfície crenada. E, F. *Weddellina squamulosa*. Oblongos com superfície ondulada. Barra: A= 100 μm ; B= 50 μm ; C-F.= 20 μm . Voucher: A. C.P. Bove et al. 2272; B, E, F. C.P. Bove et al. 1862; C. C.P. Bove et al. 1734; D. C.P. Bove et al. 2275.

Tabela 4. Localização e morfologia dos corpos silicosos de Podostemaceae neotropical. Ep: epiderme; Sb: subepiderme; Fv: células adjacentes aos feixes vasculares; A: amorfa; O: oblonga; C: curto-retangular; R: retangular; P: poliédrica; L: lobada; Li: lisa; Pe: perfurada; Eg: esparsamente granulosa; Dg: densamente granulosa; Ev: esparsamente verrugosa; Dv: densamente verrugosa; On: ondulada; Cr: crenada; La: lúmen amorfo; Lc: lúmen circular; Lp: lúmen alongado.

Táxon	Localização			Forma						Ornamentação						Lúmen				
	Ep	Sb	Fv	A	O	C	R	P	L	Li	Pe	Eg	Dg	Ev	Dv	On	Cr	La	Lc	Lp
<i>Apinagia fluitans</i>			X				X						X							
<i>Apinagia longifolia</i>		X	X			X	X						X							
<i>Apinagia richardiana</i>			X				X						X	X						
<i>Apinagia riedelii</i>			X				X						X	X						
<i>Apinagia staheliana</i>			X				X						X							
<i>Ceratolacis pedunculatum</i>	X						X	X		X										X
<i>Cipoia inserta</i>	X						X	X			X							X		
<i>Cipoia ramosa</i>	X						X	X			X							X		
<i>Diamantina lombardii</i>	X						X	X		X									X	
<i>Marathrum foeniculaceum</i>		X	X			X	X						X							
<i>Marathrum tenue</i>		X	X			X	X						X	X						
<i>Marathrum utile</i>		X	X			X	X						X	X						

Continua.

Tabela 4. Continuação.

Táxon	Localização			Forma						Ornamentação							Lúmen			
	Ep	Sb	Fv	A	O	C	R	P	L	Li	Pe	Eg	Dg	Ev	Dv	On	Cr	La	Lc	Lp
<i>Marathrum plumosum</i>		X	X			X	X						X							
<i>Mourera aspera</i>		X	X	X			X							X	X					
<i>Mourera elegans</i>		X		X			X							X	X					
<i>Mourera fluviatilis</i>		X	X	X											X					
<i>Mourera weddelliana</i>		X		X			X								X					
<i>Noveloa coulteriana</i>		X	X				X			X										
<i>Oserya perpusilla</i>		X					X						X							
<i>Podostemum ceratophyllum</i>	X						X	X		X										X
<i>Podostemum scaturiginum</i>	X						X	X								X				X
<i>Tristicha trifaria</i>	X						X		X								X			
<i>Weddellina squamulosa</i>	X															X				

3.3. Análise estatística dos corpos silicosos

A média dos comprimentos dos corpos silicosos variou de 15,4 μm (*Tristicha trifaria*) a 178,8 μm (*Noveloa coulteriana*) e das larguras de 8,5 μm (*Tristicha trifaria*) a 33,7 μm (*Weddellina squamulosa*). Diversos espécimes apresentaram o desvio padrão do comprimento e da largura superiores a 20% do valor de suas respectivas médias. Em *Apinagia longifolia*, *Marathrum foeniculaceum* e *M. plumosum* é possível notar que as médias do comprimento dos corpos silicosos oriundos das adjacências dos feixes vasculares (retangulares) são cerca de duas ou mais vezes maiores que as dos oriundos da subepiderme (curto-retangulares). Os resultados do exame estatístico dos parâmetros morfométricos (comprimento e largura) são apresentados na tabela 5.

Dado que diversas amostras violaram o princípio da normalidade, foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$) a fim de compará-las em nível intraespecífico (Tab. 6). Com essa análise foi possível notar que o comprimento e a largura apresentaram-se estatisticamente diferentes em pelo menos dois exemplares de cada uma das espécies, com exceção de *Ceratolacis pedunculatum* e *Mourera fluviatilis*. Os espécimes pertencentes à *Noveloa coulteriana*, *Podostemum ceratophyllum* e *P. scaturiginum* apresentaram somente a variável comprimento estatisticamente diferente.

Tabela 5. Dados morfométricos dos corpos silicosos (n=20) de Podostemaceae neotropical. \bar{x} : média aritmética; s: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; Li: limite inferior; Ls: limite superior. As siglas Se (subepiderme) e Fv (células adjacentes aos feixes vasculares) ao lado de táxons determinam a origem dos corpos silicosos.

Táxon	Voucher	Comprimento (μm)				Largura (μm)			
		\bar{x}	s	IC 95%		\bar{x}	s	IC 95%	
				Li	Ls			Li	Ls
<i>Apinagia fluitans</i>	Bove 1896	102,4	21,0	92,6	112,2	14,5	4,4	12,4	16,6
<i>A. longifolia</i>	Bove 1943 (Se)	26,5	6,4	23,1	29,9	17,9	3,6	16,0	19,8
	Bove 1950 (Se)	32,2	7,9	28,5	35,9	17,2	4,5	15,1	19,3
	Bove 1975 (Se)	37,8	9,0	33,6	41,9	17,1	5,5	14,6	19,7
	Bove 1943 (Fv)	61,8	24,4	50,3	73,2	16,8	5,1	14,4	19,1
	Bove 1950 (Fv)	94,1	17,3	86,0	102,1	7,3	2,9	5,9	8,6
	Bove 1975 (Fv)	64,9	13,3	58,7	71,1	10,5	2,7	9,2	11,7
<i>A. richardiana</i>	Bove 1945	81	23,6	70,0	92,0	12,7	2,9	11,4	14,1
	Bove 1972	59,8	27,1	47,1	72,4	14,4	3,4	12,8	16
	Bove 2355	76,5	24,9	64,9	88,2	11,7	3,3	10,1	13,2
<i>A. riedelii</i>	Bove 1166	95,3	27,2	82,6	108,0	9,1	1,5	8,4	9,8
	Bove 2134	74,8	32,8	59,4	90,2	16,8	5,4	14,3	19,3
<i>A. staheliana</i>	Bove 1869	45,4	14,5	38,6	52,2	6,1	1,5	5,4	6,8
<i>Ceratolacis pedunculatum</i>	Bove 2199	62,4	28,9	48,9	76,0	12,6	2,7	11,3	13,9
	Bove 2334	53,4	11,9	47,8	58,9	11,1	2,8	9,8	12,4
	Bove 2336	62,3	26,3	49,9	74,6	12,0	5,0	9,7	14,4
<i>Cipoia inserta</i>	Bove 2205	42,8	18,5	34,2	51,2	19,0	4,4	16,9	21,0
	Bove 2317	56,2	19,1	47,3	65,2	14,2	3,6	12,5	15,8
	Bove 2374	35,8	10,1	31,0	40,5	11	5,6	8,4	13,6

Continua.

Tabela 5. Continuação.

Táxon	Voucher	Comprimento (μm)				Largura (μm)			
		\bar{x}	s	IC 95%		\bar{x}	S	IC 95%	
				Li	Ls			Li	Ls
<i>Cipoia ramosa</i>	<i>Bove 2254</i>	47,8	17,3	39,7	55,9	20,6	5,1	18,2	23,0
	<i>Bove 2251</i>	53,2	8,1	49,4	57,0	26,4	5,4	23,8	28,9
	<i>Bove 2299</i>	35,7	5,8	32,9	38,4	16,0	7,3	12,6	19,4
<i>Diamantina lombardii</i>	<i>Bove 2131</i>	26,8	7,5	23,3	30,4	14,5	2,4	13,4	15,7
	<i>Bove 2201</i>	17,6	2,8	16,3	18,9	9,7	2,8	8,4	11,0
	<i>Bove 2253</i>	30,1	6,9	26,9	33,4	15	3,8	13,2	16,8
<i>Marathrum foeniculaceum</i>	<i>Bove 1627 (Se)</i>	43,5	7,3	40,1	46,9	22,5	5,1	20,2	24,9
	<i>Bove 1630 (Se)</i>	30,8	3,7	29,0	32,5	18,2	3,2	16,6	19,7
	<i>Bove 1627 (Fv)</i>	80,4	23,3	69,5	91,3	11,8	2,9	10,5	13,2
	<i>Bove 1630 (Fv)</i>	63,9	27,0	44,6	83,3	14,2	5,3	10,4	18,0
<i>M. plumosum</i>	<i>Bove 1629 (Se)</i>	26,6	4,3	24,6	28,7	15,2	3,7	13,5	16,9
	<i>Bove 1629 (Fv)</i>	42,3	15,3	35,2	49,5	11,2	2,9	9,8	12,5
<i>M. tenue</i>	<i>Philbrick 5926 (Se)</i>	30,0	6,4	27,0	33,0	16,6	4,1	14,7	18,5
	<i>Philbrick 5934 (Se)</i>	32,7	6,4	29,7	35,7	19,5	4,41	17,5	21,6
	<i>Philbrick 5957 (Se)</i>	30,0	8,0	26,3	33,8	13,4	6,0	10,6	16,2
	<i>Philbrick 5926 (Fv)</i>	70,3	16,0	55,4	85,2	12,5	3,5	9,2	15,8
	<i>Philbrick 5934 (Fv)</i>	42,8	7,9	38,9	46,7	16,4	3,4	14,8	18,1
	<i>Philbrick 5957 (Fv)</i>	56,5	16,3	48,8	64,2	12,4	4,3	10,3	14,4
<i>M. utile</i>	<i>Philbrick 5886 (Se)</i>	33,7	6,3	29,2	38,2	23,8	2,86	21,7	25,8
	<i>Philbrick 5886 (Fv)</i>	33,8	18,3	25,2	42,4	10,7	4,3	8,7	12,8
<i>Mourera aspera</i>	<i>Bove 1080</i>	42,8	11,8	37,3	48,4	16,1	5,0	13,8	18,4
	<i>Bove 1343</i>	40,6	10,1	35,9	45,3	18,7	3,3	17,2	20,3

Continua.

Tabela 5. Continuação.

Táxon	Voucher	Comprimento (µm)				Largura (µm)			
		\bar{x}	s	IC 95%		\bar{x}	s	IC 95%	
				Li	Ls			Li	Ls
<i>Mourera aspera</i>	<i>Bove 2260</i>	62,6	21,2	52,7	72,6	29,5	9,8	24,9	34,1
	<i>Bove 2304</i>	59,3	9,6	54,8	63,7	30,9	8,0	27,1	34,6
<i>M. elegans</i>	<i>Bove 1713</i>	72,5	21,3	62,6	82,5	24,8	10,3	20,0	29,6
	<i>Bove 1718</i>	52,0	15,6	44,7	59,3	15,7	4,4	13,6	17,7
	<i>Bove 1899</i>	64,9	14,2	58,2	71,5	25,8	4,8	23,5	28,0
<i>M. fluviatilis</i>	<i>Bove 1944</i>	42,3	7,4	38,8	45,7	23,6	4,1	21,7	25,5
	<i>Bove 2285</i>	39,6	12,7	33,7	45,6	20,9	4,6	18,7	23,0
	<i>Bove 2289</i>	38,6	11,4	33,3	43,9	21,9	4,5	19,8	24,0
<i>Mourera weddelliana</i>	<i>Bove 1738</i>	39,0	9,8	34,4	43,6	17,8	4,2	15,8	19,7
	<i>Bove 2297</i>	59,4	10,3	54,5	64,2	22,5	7,5	19,0	26,0
<i>Noveloa coulteriana</i>	<i>Bove 1628</i>	178,8	25,4	166,9	190,7	25,2	7,0	21,9	28,5
	<i>Bove 1631</i>	134,5	24,8	122,9	146,1	20,9	8,5	16,9	24,9
	<i>Bove 1634</i>	95,9	24,3	84,5	107,3	23,6	10,7	18,6	28,6
<i>Oserya perpusilla</i>	<i>Bove 1946</i>	87,8	30,7	73,5	102,2	14,2	3,8	12,4	15,9
	<i>Bove 1956</i>	73,0	32,3	57,9	88,1	15,8	8,9	11,9	19,7
	<i>Bove 2327</i>	39,8	14,7	32,9	46,7	17,0	3,2	15,5	18,5
<i>Podostemum ceratophyllum</i>	<i>Philbrick 4634</i>	49,1	20,1	39,6	58,5	16,5	4,2	14,5	18,4
	<i>Philbrick 4639</i>	39,6	12,0	34,0	45,2	17,8	5,8	15,1	20,5
	<i>Weeb 4226</i>	70,1	19,1	61,2	79,0	15,6	3,1	14,2	17,1

Continua.

Tabela 5. Continuação.

Táxon	Voucher	Comprimento (μm)				Largura (μm)			
		\bar{x}	s	IC 95%		\bar{x}	s	IC 95%	
				Li	Ls			Li	Ls
<i>P. scaturiginum</i>	<i>Bove 1030</i>	49,0	12,0	43,4	54,6	20,3	4,1	18,4	22,3
	<i>Bove 2245</i>	42,5	13,0	36,4	48,6	20	3,5	18,4	21,6
	<i>Moço 47</i>	33,7	8,4	29,7	37,6	17,9	4,8	15,7	20,2
<i>Tristicha trifaria</i>	<i>Bove 1734</i>	15,5	2,1	14,5	16,5	11	2,5	9,8	12,2
	<i>Bove 2272</i>	15,4	2,2	14,3	16,4	10,6	1,6	9,8	11,3
	<i>Bove 2275</i>	19,6	4,3	17,6	21,6	8,5	1,3	7,9	9,0
<i>Weddellina squamulosa</i>	<i>Bove 1862</i>	33,8	5,5	31,2	36,4	21,0	4,0	19,1	22,9
	<i>Bove 2042</i>	48,1	8,1	44,3	51,9	33,7	5,0	31,4	36,0
	<i>Bove 2350</i>	33,3	5,0	31,0	35,7	21	5,4	18,4	23,5

Tabela 6. Comparação intraespecífica das amostras através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Do = diferença observada; Dc = diferença crítica; Dif = diferença entre as amostras da mesma espécie; Se = corpos silicosos oriundos da subepiderme; Fv = corpos silicosos oriundos das células adjacentes ao feixe vascular.

Voucher	Comprimento			Largura		
	Do	Dc	Dif	Do	Dc	Dif
<i>Apinagia longifolia</i> (Se)						
Bove 1943 - Bove 1950	4,52	13,22	Não	7,12	13,22	Não
Bove 1943 - Bove 1975	13,92	13,22	Sim	30,52	13,22	Sim
Bove 1950 - Bove 1975	9,40	13,22	Não	23,40	13,22	Sim
<i>Apinagia longifolia</i> (Fv)						
Bove 1943 - Bove 1950	24,30	13,22	Sim	31,72	13,22	Sim
Bove 1943 - Bove 1975	3,30	13,22	Não	16,57	13,22	Sim
Bove 1950 - Bove 1975	21	13,22	Sim	15,15	13,22	Sim
<i>Apinagia richardiana</i>						
Bove 1945 - Bove 1972	14,87	13,22	Sim	6,6	13,22	Não
Bove 1945 - Bove 2355	3,05	13,22	Não	6,75	13,22	Não
Bove 1972 - Bove 2355	11,82	13,22	Não	13,35	13,22	Sim
<i>Ceratolacis pedunculatum</i>						
Bove 2199 - Bove 2334	2,57	13,22	Não	8,9	13,22	Não
Bove 2199 - Bove 2336	0,85	13,22	Não	4,75	13,22	Não
Bove 2334 - Bove 2336	3,42	13,22	Não	4,15	13,22	Não
<i>Cipoia inserta</i>						
Bove 2205 - Bove 2317	14,10	13,22	Sim	14,85	13,22	Sim
Bove 2205 - Bove 2374	4,95	13,22	Não	26,62	13,22	Sim
Bove 2317 - Bove 2374	19,05	13,22	Sim	11,77	13,22	Não
<i>Cipoia ramosa</i>						
Bove 2251 - Bove 2254	10,52	13,22	Não	14,80	13,22	Sim
Bove 2251 - Bove 2299	24,57	13,22	Sim	24,57	13,22	Sim
Bove 2254 - Bove 2299	14,05	13,22	Sim	9,77	13,22	Não
<i>Diamantina lombardii</i>						
Bove 2231 - Bove 2201	22,8	13,22	Sim	22,9	13,22	Sim
Bove 2231 - Bove 2253	6,67	13,22	Não	0,4	13,22	Não
Bove 2201 - Bove 2253	29,47	13,22	Sim	23,3	13,22	Sim
<i>Marathrum tenue</i> (Se)						
Philbrick 5626 - Philbrick 5934	6,92	13,22	Não	9,99	13,22	Não
Philbrick 5626 - Philbrick 5957	1,52	13,22	Não	9,32	13,22	Não
Philbrick 5934 - Philbrick 5957	8,45	13,22	Não	19,25	13,22	Sim

Continua.

Tabela 6. Continuação.

Voucher	Comprimento			Largura		
	Do	Dc	Dif	Do	Dc	Dif
<i>Marathrum tenue</i> (Fv)						
<i>Philbrick 5626 - Philbrick 5934</i>	21,61	14,0	Sim	11,68	14,00	Não
<i>Philbrick 5626 – Philbrick 5957</i>	9,80	13,8	Não	1,35	13,80	Não
<i>Philbrick 5934 – Philbrick 5957</i>	11,81	10,2	Sim	13,03	10,21	Sim
<i>Mourera aspera</i>						
<i>Bove 1080 - Bove 1343</i>	3,55	19,38	Não	10,1	19,38	Não
<i>Bove 1080 - Bove 2260</i>	23,10	19,38	Sim	36,57	19,38	Sim
<i>Bove 1080 - Bove 2304</i>	25,45	19,38	Sim	41,12	19,38	Sim
<i>Bove 1343 - Bove 2260</i>	26,65	19,38	Sim	26,47	19,38	Sim
<i>Bove 1343 - Bove 2304</i>	29,00	19,38	Sim	31,02	19,38	Sim
<i>Bove 2260 - Bove 2304</i>	2,35	19,38	Não	4,55	19,38	Não
<i>Mourera elegans</i>						
<i>Bove 1713 - Bove 1718</i>	18,65	13,22	Sim	18,9	13,22	Sim
<i>Bove 1713 - Bove 1899</i>	4,85	13,22	Não	6,3	13,22	Não
<i>Bove 1718 - Bove 1899</i>	13,77	13,22	Sim	25,2	13,22	Sim
<i>Mourera fluviatilis</i>						
<i>Bove 1944 - Bove 2285</i>	8,55	13,22	Não	10,95	13,22	Não
<i>Bove 1944 - Bove 2289</i>	10,05	13,22	Não	5,85	13,22	Não
<i>Bove 2285 - Bove 2289</i>	1,5	13,22	Não	5,1	13,22	Não
<i>Noveloa coulteriana</i>						
<i>Bove 1628 - Bove 1631</i>	18,07	13,22	Sim	9,45	13,22	Não
<i>Bove 1628 - Bove 1634</i>	34,87	13,22	Sim	4,02	13,22	Não
<i>Bove 1631 - Bove 1634</i>	16,8	13,22	Sim	5,45	13,22	Não
<i>Oserya perpusilla</i>						
<i>Bove 1946 - Bove 1956</i>	7,35	13,22	Não	1,97	13,22	Não
<i>Bove 1946 - Bove 2327</i>	26,7	13,22	Sim	13,47	13,22	Sim
<i>Bove 1956 - Bove 2327</i>	19,7	13,22	Sim	11,50	13,22	Não
<i>Podostemum ceratophyllum</i>						
<i>Webb 4226 - Philbrick 4634</i>	18,65	13,22	Sim	0,12	13,22	Não
<i>Webb 4226 - Philbrick 4639</i>	26,65	13,22	Sim	3,47	13,22	Não
<i>Philbrick 4634 - Philbrick 4639</i>	8,00	13,22	Não	3,35	13,22	Não

Continua.

Tabela 6. Continuação.

Voucher	Comprimento			Largura		
	Do	Dc	Dif	Do	Dc	Dif
<i>Podostemum scaturiginum</i>						
<i>Bove 1030 - Bove 2245</i>	9,85	13,22	Não	0,32	13,22	Não
<i>Bove 1030 - Moço 47</i>	22,80	13,22	Sim	10,00	13,22	Não
<i>Bove 2245 - Moço 47</i>	12,97	13,22	Não	10,32	13,22	Não
<i>Tristicha trifaria</i>						
<i>Bove 1734 - Bove 2272</i>	0,10	13,22	Não	0,75	13,22	Não
<i>Bove 1734 - Bove 2275</i>	17,82	13,22	Sim	19,50	13,22	Sim
<i>Bove 2272 - Bove 2275</i>	17,72	13,22	Sim	18,75	13,22	Sim
<i>Weddellina squamulosa</i>						
<i>Bove 1862 - Bove 2042</i>	0,6	13,22	Não	0,8	13,22	Não
<i>Bove 1862 - Bove 2350</i>	26,02	13,22	Sim	27,35	13,22	Sim
<i>Bove 2042 - Bove 2350</i>	26,62	13,22	Sim	28,15	13,22	Sim

3.4. Aspectos evolutivos dos corpos silicosos

Foi elaborada uma lista de caracteres e seus estados (Tab. 7) com os dados qualitativos referentes à presença, localização e morfologia dos corpos silicosos e uma matriz com os terminais e respectivos dados (Tab. 8). Posteriormente, essas informações foram dispostas no cladograma de consenso (Fig. 11).

Tabela 7. Lista de caracteres referentes aos corpos silicosos em folhas de Podostemaceae e seus respectivos estados

Caráter	Estados
1. Corpos silicosos	(0) presentes; (1) ausentes
2. Corpos silicosos, localização	(0) epiderme; (1) feixe vascular; (2) subepiderme
3. Corpos silicosos, forma	(0) amorfa; (1) oblonga; (2) retangular; (3) poliédrica; (4) lobada
4. Corpo silicosos, ornamentação	(0) lisa; (1) perfurada; (2) granulosa; (3) verrugosa; (4) ondulada; (5) crenada
5. Corpos silicosos, ornamentação, lúmen	(0) presente; (1) ausente
6. Corpos silicosos, ornamentação, lúmen, forma	(0) amorfo; (1) circular; (2) alongado

Tabela 8. Matriz de dados para os caracteres estudados referentes aos corpos silicosos. Os números se referem aos caracteres e respectivos estados expressos na tabela 7.

Táxon	Caráter					
	1	2	3	4	5	6
<i>Apinagia corymbosa</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Apinagia fimbriifolia</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Apinagia fluitans</i>	0	2	2	2	1	-
<i>Apinagia longifolia</i>	0	1, 2	2	2	1	-
<i>Apinagia richardiana</i>	0	2	2	2	1	-
<i>Apinagia riedelii</i>	0	2	2	2	1	-
<i>Apinagia staheliana</i>	0	2	2	2	1	-
<i>Autana andersonii</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Castelnavia fluitans</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Castelnavia monandra</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Castelnavia multipartita</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Castelnavia noveloi</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Castelnavia pendulosa</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Castelnavia princeps</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Ceratolacis pedunculatum</i>	0	0	2, 3	0	0	2
<i>Cipoia inserta</i>	0	0	2, 3	1	0	0
<i>Cipoia ramosa</i>	0	0	2, 3	1	0	0
<i>Diamantina lombardii</i>	0	0	2, 3	1	0	1
<i>Jenmaniella ceratophylla</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Jenmaniella fimbriata</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Lophogyne lacunosa</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Marathrum aeroginosum</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Marathrum foeniculaceum</i>	0	1, 2	2	2	1	-

Continua.

Tabela 8. Continuação.

Táxon	Caráter					
	1	2	3	4	5	6
<i>Monostylis capillacea</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Mourera aspera</i>	0	1, 2	0, 2	3	1	-
<i>Mourera elegans</i>	0	2	0, 2	3	1	-
<i>Mourera fluviatilis</i>	0	1, 2	0	3	1	-
<i>Mourera weddelliana</i>	0	2	0, 2	3	1	-
<i>Noveloa coulteriana</i>	0	1, 2	2	0	1	-
<i>Oserya perpusilla</i>	0	2	2	2	1	-
<i>Podostemum ceratophyllum</i>	0	0	2, 3	0	0	2
<i>Podostemum scaturiginum</i>	0	0	2, 3	4	0	2
<i>Tristicha trifaria</i>	0	0	2, 4	5	1	-
<i>Weddellina squamulosa</i>	0	0	1	4	1	-

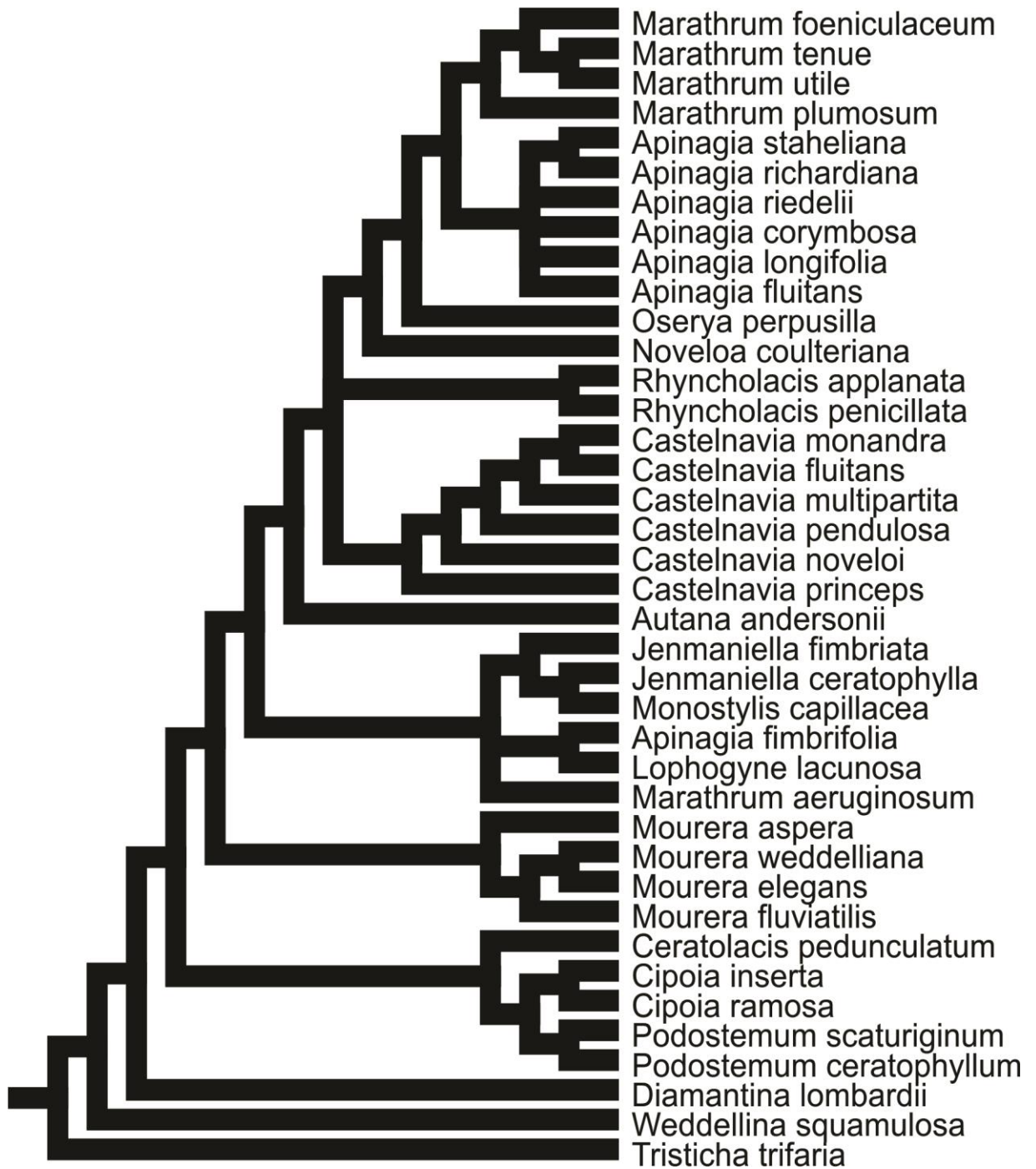


Figura 12. Cladograma de consenso das filogenias propostas por Ruhfel *et al.* (2011) e Tippery *et al.* (2011) de táxons neotropicais de Podostemaceae.

Os corpos silicosos foram encontrados nos representantes das subfamílias *Tristichoideae* e *Weddellinoideae*, assim como nos gêneros mais basais de *Podostemoideae* (*Diamantina lombardii*, *Ceratolacis* (*Cipoia* + *Podostemum*) e *Mourera*). Portanto a presença dessas estruturas na subfamília *Podostemoideae* é uma plesiomorfia. A ausência de corpos silicosos é uma apomorfia homoplásica em *Podostemoideae*, pois surge duas vezes nesta subfamília: no clado *Marathrum aeroginosum* (*Apinagia fimbriifolia* + *Lophogyne lacunosa*) (*Jenmaniella* + *Monostylis*); juntamente com o clado *Autana* (*Castelnavia* + *Rhyncholacis*) e independentemente na espécie *Apinagia corymbosa*. A reversão para o estado “presença” surge no ancestral do clado *Noveloa* (*Oserya* (*Apinagia* + *Marathrum*)) (Fig. 12).

Corpos silicosos localizados nas células epidérmicas é o estado plesiomórfico em *Podostemoideae*, pois é encontrado nos representantes das subfamílias *Tristichoideae*, *Weddellinoideae* e nos gêneros mais basais de *Podostemoideae* (*Diamantina* e *Ceratolacis* (*Cipoia* + *Podostemum*)). Corpos silicosos na subepiderme é uma sinapomorfia para as espécies de *Mourera* que surge independentemente no ancestral de *Noveloa* (*Oserya* (*Apinagia*+ *Marathrum*)), desaparecendo posteriormente em algumas espécies de *Apinagia*. A presença de corpos silicosos em células adjacentes ao feixe vascular ocorre em duas espécies de *Mourera* não estreitamente relacionadas (*M. aspera* e *M. fluviatilis*), em *Noveloa* e em todas as espécies de *Apinagia* e *Marathrum* que possuem corpos silicosos (Fig. 13).

Caráter: Corpos silicosos

■ Presentes
□ Ausentes

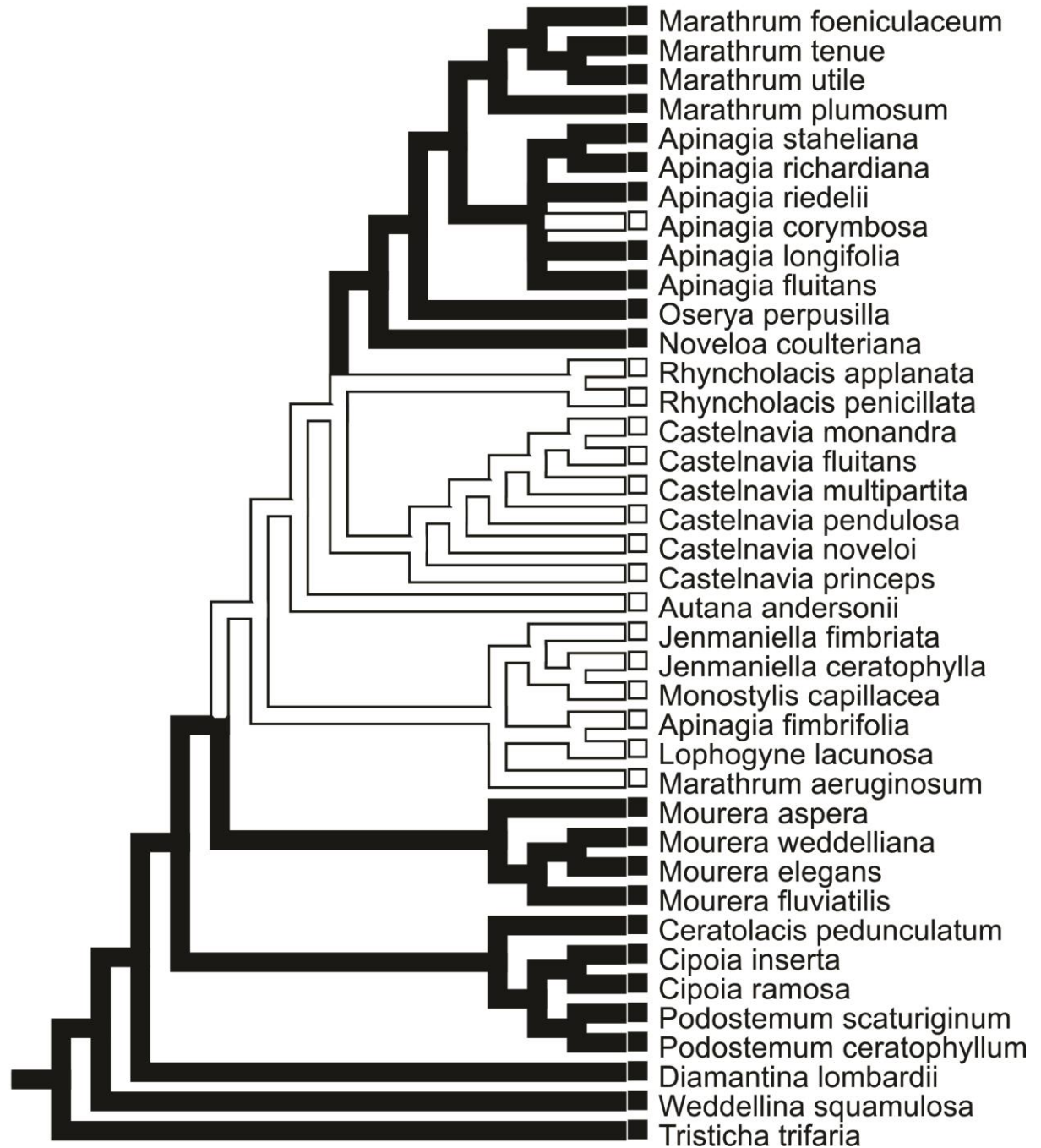


Figura 13. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso da evolução para a presença dos corpos silicosos. Os quadrados nos terminais indicam as espécies que foram analisadas.

Caráter: Corpos silicosos, localização

- Epiderme
- Feixe vascular
- Subpiderme
- Não aplicável

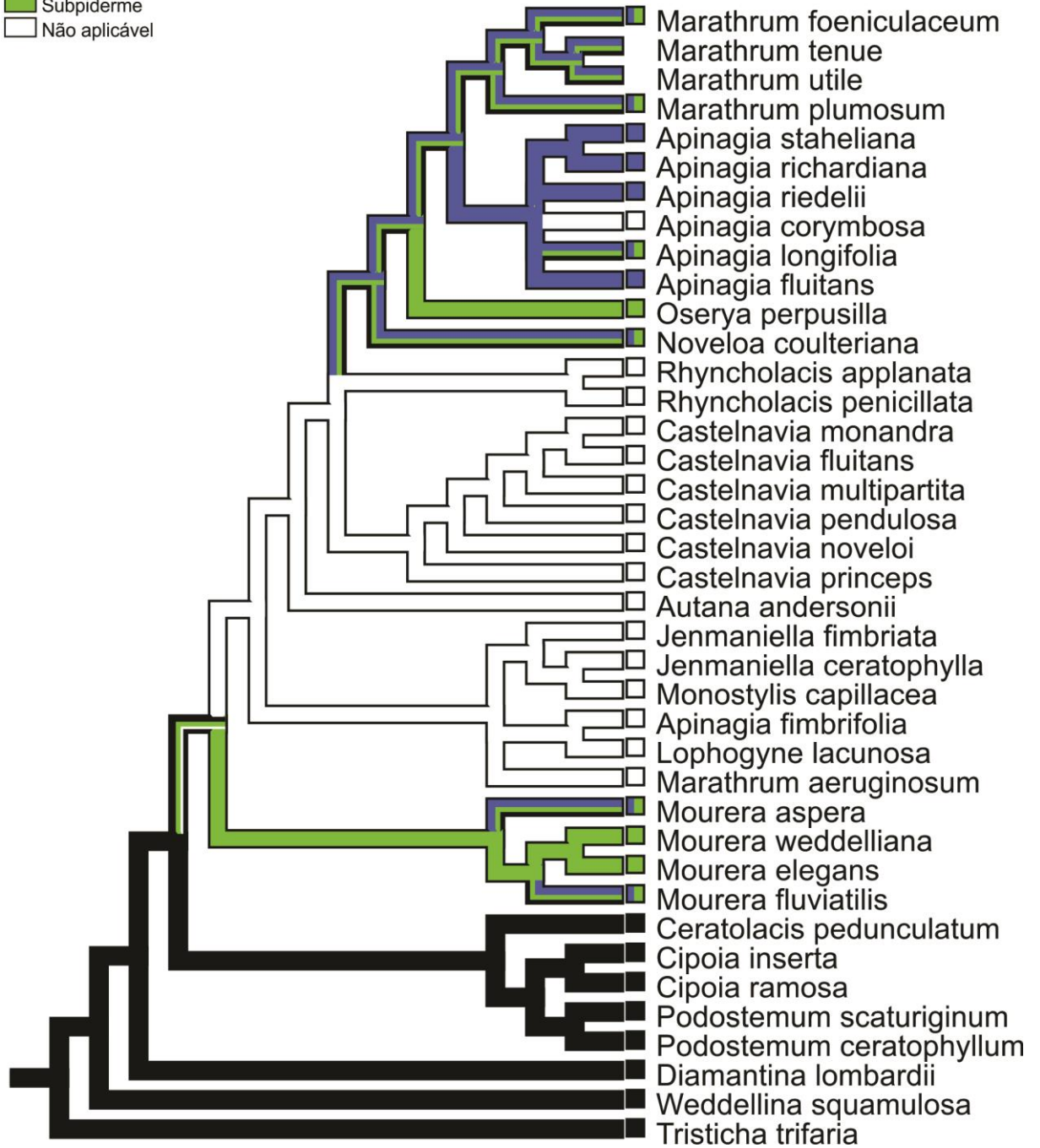


Figura 14. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso para a evolução da localização dos corpos silicosos. Os quadrados nos terminais indicam as espécies que foram analisadas.

Os corpos silicosos com forma lobada são encontrados exclusivamente em *Tristicha trifaria*. A forma oblonga constitui uma autapomorfia para *Weddellina squamulosa*, por conseguinte para a subfamília *Weddellinoideae*. A forma retangular é um estado plesiomórfico para *Podostemoideae*, sendo encontrada em todas as espécies desta subfamília que possuem cristais de sílica, com exceção de *Mourera fluviatilis*. A ocorrência da forma poliédrica é um estado apomórfico, encontrado na espécie mais basal de *Podostemoideae* (*Diamantina lombardii*), assim como no clado *Ceratolacis* (*Cipoia* + *Podostemum*). Corpos silicosos amorfos é uma sinapomorfia exclusiva do gênero *Mourera*; a ausência da forma retangular é uma autapomorfia de *M. fluviatilis*, apesar de ser compartilhada com a subfamília *Weddellinoideae* (Fig. 14).

A ornamentação crenada é encontrada exclusivamente em *Tristicha trifaria*. A superfície ondulada também é um estado exclusivo de *Weddellinoideae* que surge independentemente em *Podostemum scaturiginum*. A superfície perfurada é uma autapomorfia homoplásica de *Diamantina* e *Cipoia*. A superfície lisa surge independentemente *Ceratolacis*, *Podostemum ceratophyllum* e *Noveloa*, sendo também considerada uma autapomorfia homoplásica. A ornamentação verrugosa constitui uma sinapomorfia exclusiva das espécies do gênero *Mourera*. A ornamentação granulosa encontra-se restrita ao clado mais apical da família (*Oserya* (*Apinagia* + *Marathrum*)) (Fig. 15).

A presença de lúmen na superfície dos corpos silicosos é um estado apomórfico em *Podostemoideae*, encontrando-se restrita aos representantes basais dessa subfamília [*Diamantina* e *Ceratolacis* + (*Cipoia* + *Podostemum*)] (Fig. 16). Lúmen circular é uma autapomorfia de *Diamantina*. O lúmen alongado é uma sinapomorfia para o clado *Ceratolacis* (*Cipoia* + *Podostemum*), com a perda deste estado em *Cipoia*, enquanto o estado amorfo é uma sinapomorfia do gênero *Cipoia* (Fig. 17).

Caráter: Corpos silicosos, forma

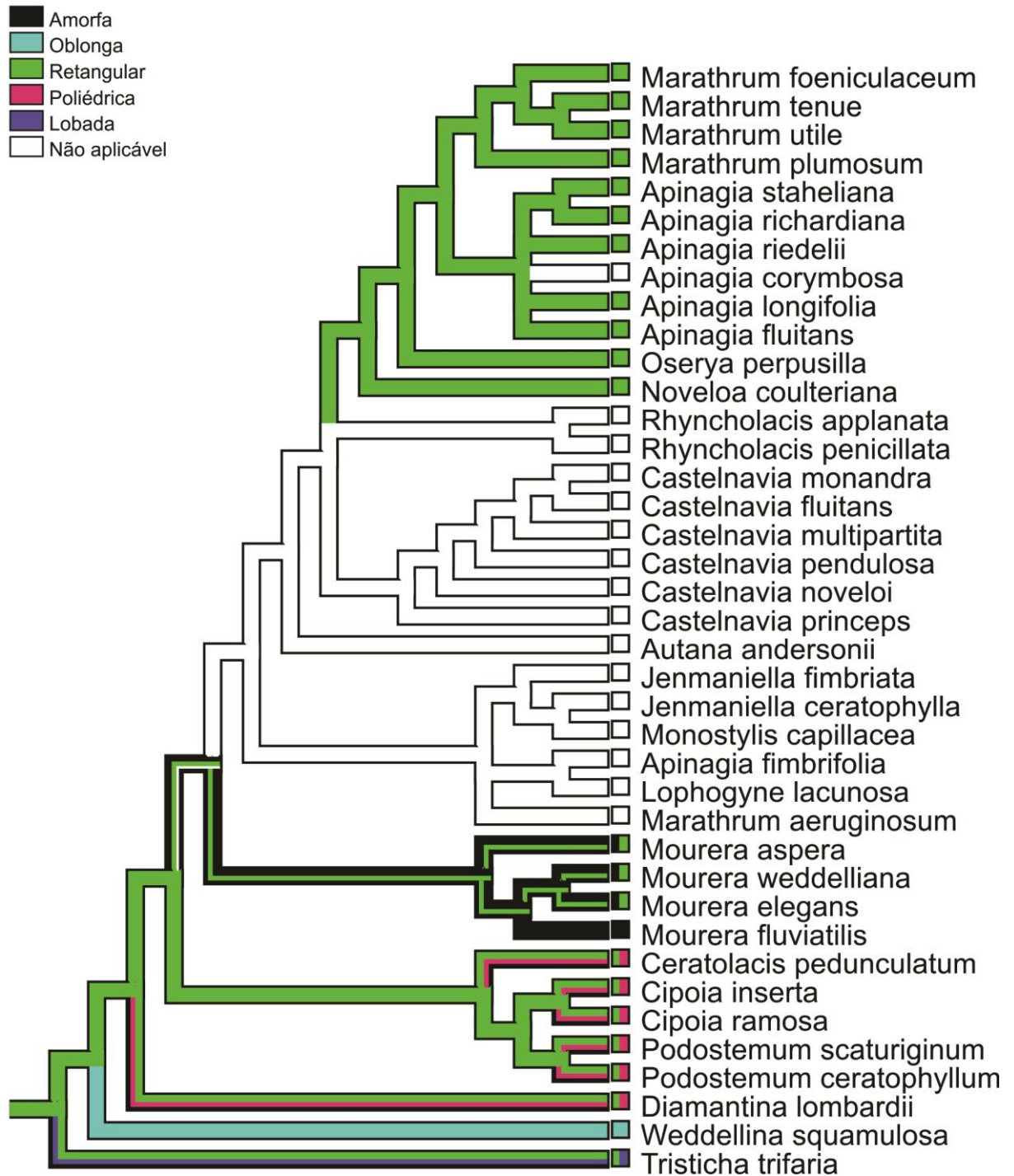


Figura 15. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso para a evolução da forma dos corpos silicosos. Os quadrados nos terminais indicam as espécies que foram analisadas.

Caráter: Corpos silicosos, ornamentação

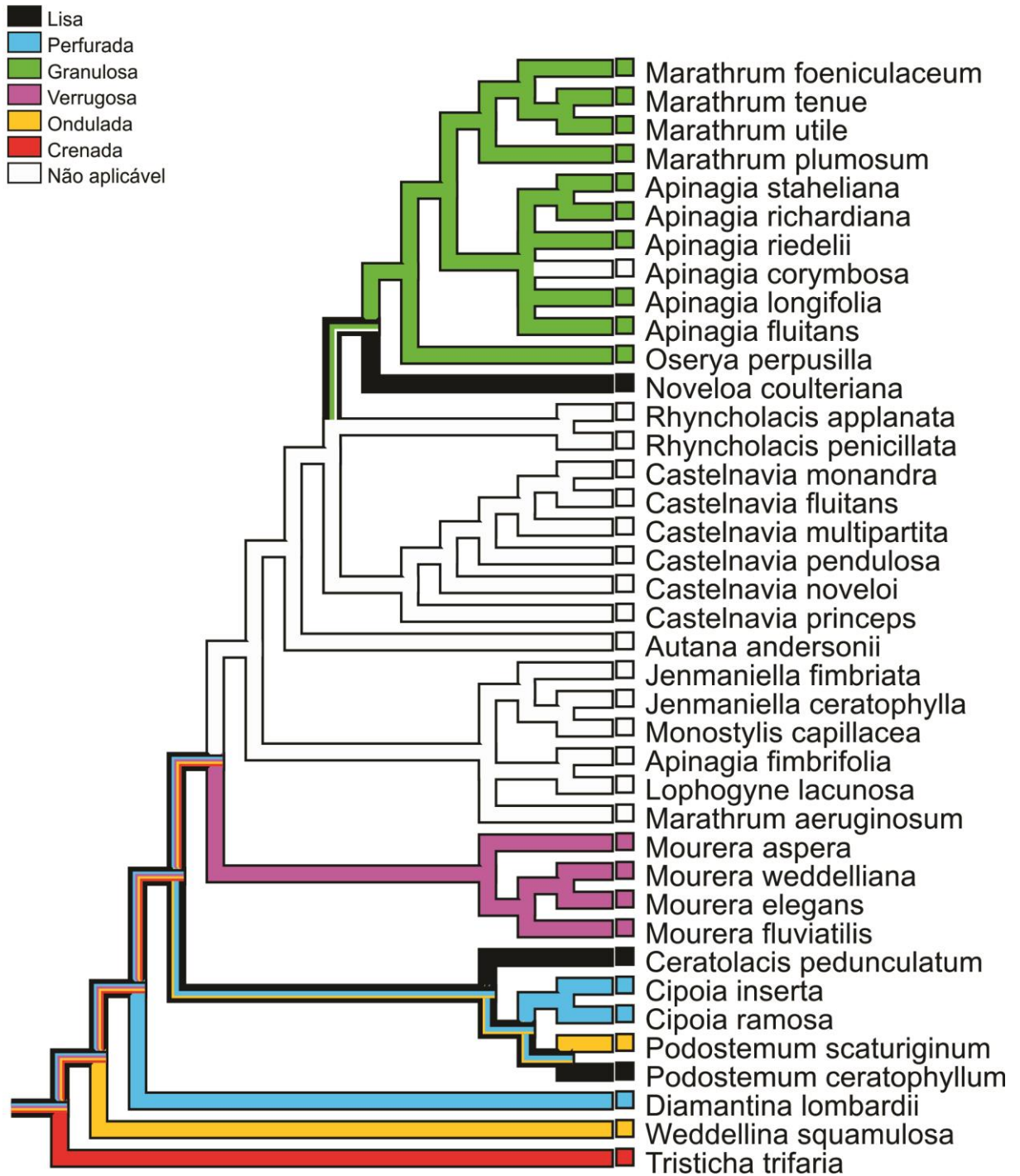


Figura 16. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso da evolução da ornamentação dos corpos silicosos. Os quadrados nos terminais indicam as espécies que foram analisadas.

Caráter: Corpos silicosos, lúmen

- Presente
- Ausente
- Não aplicável

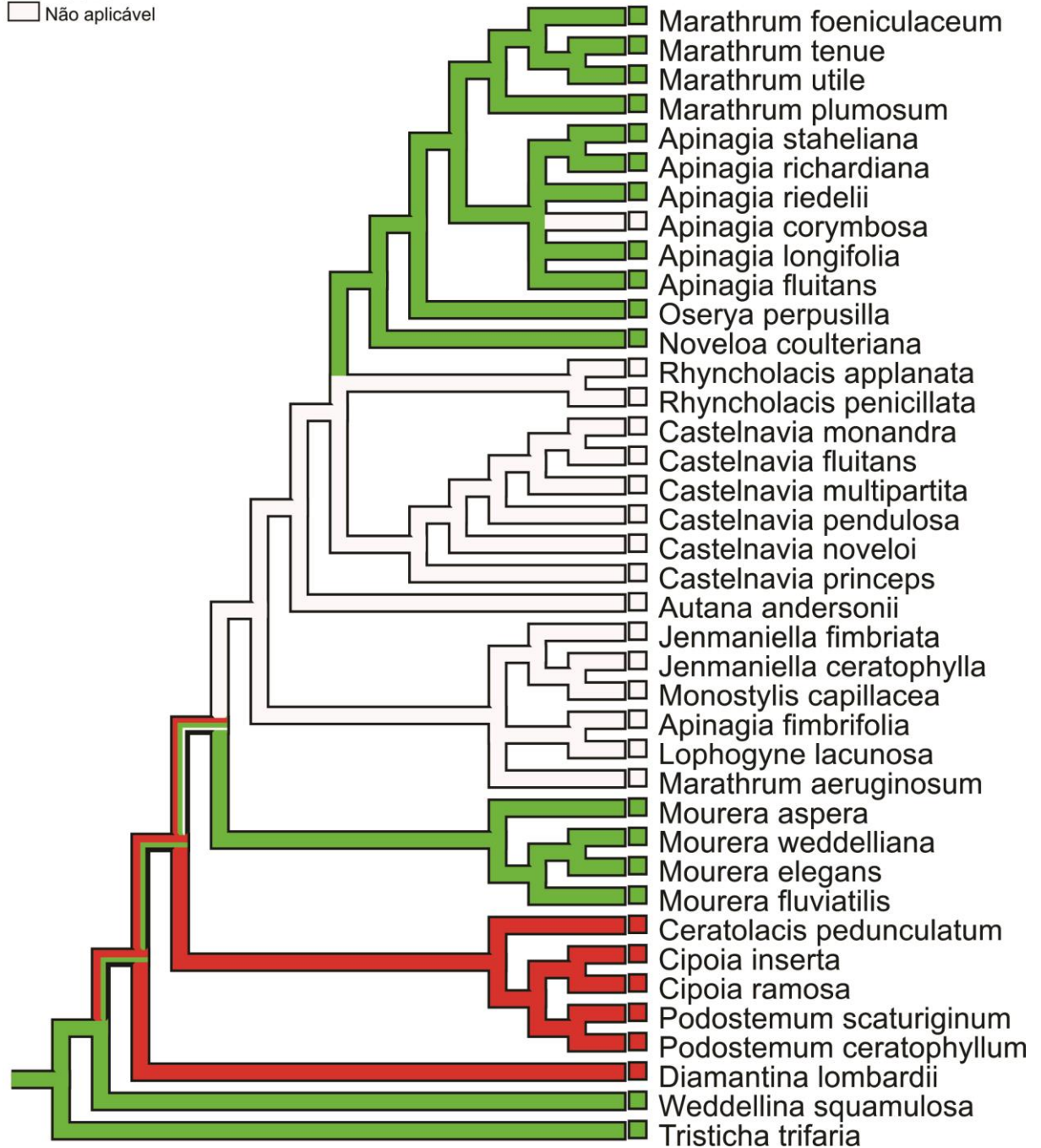


Figura 17. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso da evolução da presença do lúmen nos corpos silicosos. Os quadrados nos terminais indicam as espécies que foram analisadas.

Caráter: Corpos silicosos, lúmen, forma

- Amorfa
- Circular
- Alongado
- Não aplicável

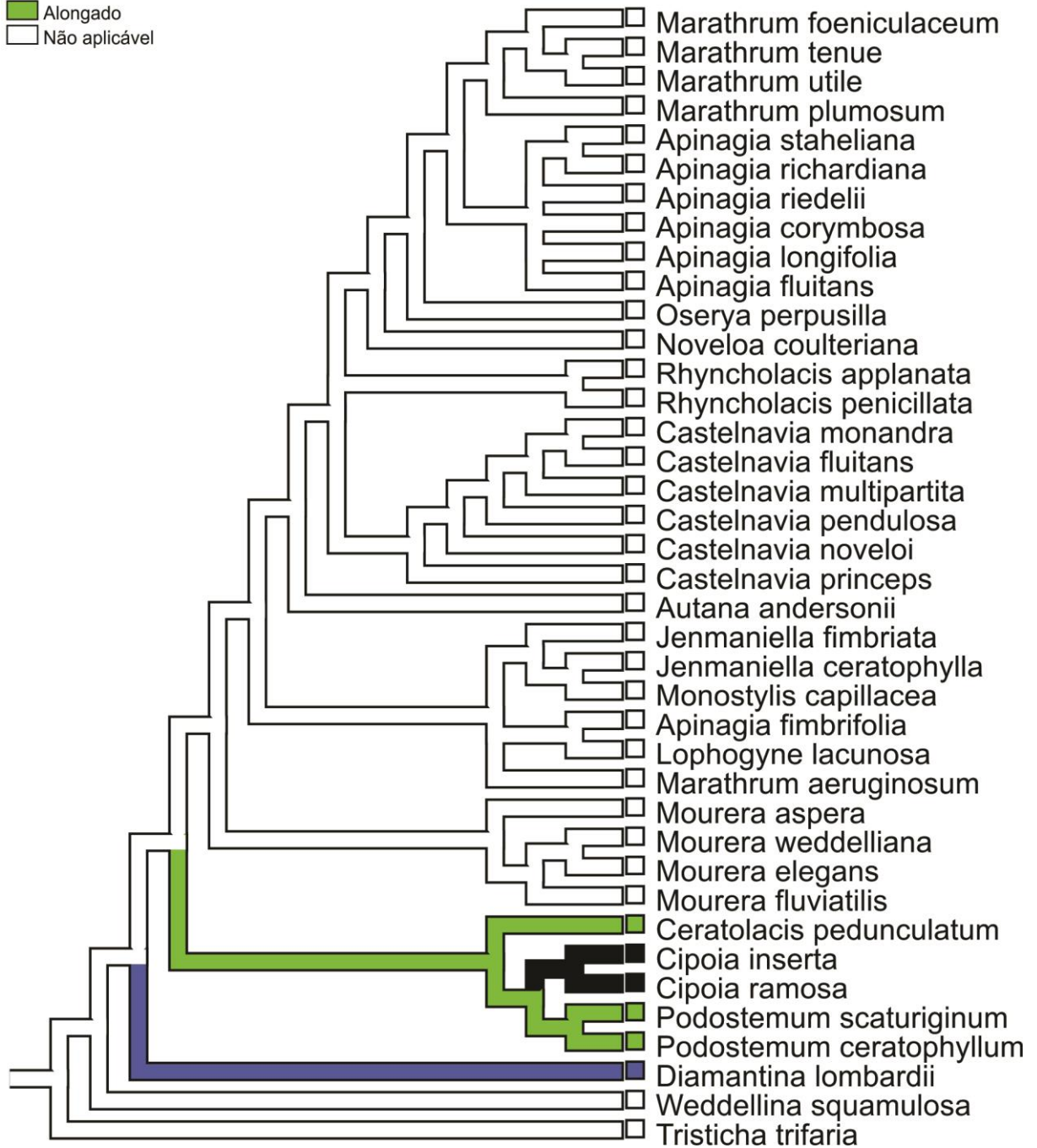


Figura 18. Árvore filogenética de Podostemaceae exibindo o traçado mais parcimonioso da evolução da forma do lúmen nos corpos silicosos. Os quadrados nos terminais indicam as espécies que foram analisadas.

4. DISCUSSÃO

4.1. Presença-ausência de corpos silicosos

A presença de sílica em Malpighiales é relatada apenas nas famílias não estreitamente relacionadas às Podostemaceae, ou seja, externas ao clado dos Clusióides, como Euphorbiaceae (BERRY & WIEDENHOEFT, 2004), Erythroxylaceae (RURY, 1981) e Chrysobalanaceae (WELLE, 1976). Não há registros na literatura para a ocorrência de corpos silicosos em Hypericaceae, grupo irmão de Podostemaceae. No entanto, esta ausência de referência da presença dessas estruturas deve ser tratada com cautela, pois não significa que não ocorram, mas talvez porque não foram investigadas, uma vez que sua ausência também não é explicitamente mencionada. Apesar de corpos silicosos serem frequentemente relatados para Podostemaceae, Hodson *et al.* (2005) não a incluíram na lista de famílias que possuem representantes com sílica. De acordo com Arber (1920), Podostemaceae assemelha-se às demais hidrófitas submersas por caracteres como a redução do tecido xilemático e ausência de estômatos e diverge pela grande quantidade de corpos silicosos nas células. Analogamente ao que foi aqui relatado para os táxons neotropicais da família, a presença ou ausência de corpos silicosos também ocorre nos representantes paleotropicais das subfamílias *Tristichoideae* (RUTISHAUSER & HUBER, 1991; MATHEW *et al.*, 2001) e *Podostemoideae* (AMEKA *et al.*, 2002; AMEKA *et al.*, 2003).

Jäger-Zürn (2011) afirmou que os órgãos vegetativos de espécies dos gêneros *Apinagia*, *Marathrum* e *Mourera* são desprovidos de corpos silicosos. Adicionalmente, Steude (1935), que realizou uma análise anatômica detalhada de *Mourera aspera* em microscopia óptica e Rutishauser & Grubert (1994) que analisaram *M. fluviatilis* em microscopia eletrônica de varredura não mencionaram a presença dessas estruturas. Nossos resultados, além de relatarem corpos silicosos para esses táxons, corroboram com o relato da presença dessas estruturas em: *Apinagia richardiana* (SCHNELL, 1967), *Diamantina lombardii* (RUTISHAUSER *et al.*, 2005), *Mourera aspera* (WARMING, 1888), *Podostemum ceratophyllum* (WARMING, 1881), *P. scaturiginum* (WARMING, 1899), *Tristicha trifaria* (CARIO, 1881) e *Weddellina squamulosa* (WÄCHTER, 1897). Para as demais espécies, tanto a sua presença, quanto sua ausência é aqui relatada de forma inédita.

A existência ou não de corpos silicosos foi um caráter constante nos gêneros analisados, com exceção de *Apinagia* e *Marathrum*. Estes gêneros apresentaram espécies nas quais os corpos silicosos estavam presentes (*A. fluitans*, *A. longifolia*, *A. richardiana*, *A. riedelii*, *A. staheliana*, *M. foeniculaceum* e *M. plumosum*) ou ausentes (*A. corymbosa*, *A. fimbriifolia* e *M. aeruginosum*). É interessante atentar para o fato de que estes gêneros são taxonomicamente mal definidos e sua delimitação não é clara, motivo pelo qual se encontram em processo de revisão (C.P. Bove, comunicação pessoal). Condição semelhante a esta foi relatada para o gênero paleotropical *Polypterum* (Tul.) Warm, por Jäger-Zürn (2011); onde, das quatro espécies analisadas somente *P. minus* (Wedd.) Nagendran, Arekal & Subramanyam, apresentou essas estruturas.

Espécies que apresentam e as que não apresentam corpos silicosos podem ocorrer simpatricamente (C.P. Bove, pers. com.), às vezes ocorrendo na mesma rocha (e.g.: *Lophogyne lacunosa* e *Tristicha trifaria*). Tal fato indica que a presença de corpos silicosos não é condicionada simplesmente por fatores ambientais, reforçando a importância taxonômica e filogenética deste caráter.

4.2. Localização dos corpos silicosos

Os corpos silicosos foram encontrados em três regiões histológicas distintas das folhas: epiderme, subepiderme e nas células adjacentes aos feixes vasculares. Solereder (1908) e Cook & Rutishauser (2007) apontaram que, na família Podostemaceae, os corpos silicosos geralmente ocupam os extratos periféricos (*i.e.* camadas epidérmicas e subepidérmicas) das raízes, caule e folhas, formando uma carapaça; se apresentando de forma contínua no tecido epidérmico e não contínua no subepidérmico (SOLEDER, 1908). Todas as espécies analisadas que apresentaram corpos silicosos no tecido epidérmico (e.g. *Diamantina lombardii*) ou subepidérmico (e.g. *Mourera elegans*) corroboraram essa informação. O primeiro relato da ocorrência de corpos silicosos nas células adjacentes aos feixes vasculares para a família foi realizado por Schnell (1967), para *Apinagia flexuosa* e *A. richardiana*. Neste estudo relatamos essa condição para *Apinagia fluitans*, *A. longifolia*, *A. richardiana*, *A. riedelii*, *A. staheliana*, *Marathrum foeniculaceum*, *M.*

plumosum, *Mourera aspera*, *M. fluviatilis* e *Noveloa coulteriana*. Não foram encontrados registros na literatura para a ocorrência dessas estruturas em duas regiões histológicas distintas simultaneamente (subepiderme e células adjacentes aos feixes vasculares), como aqui descrito para *Apinagia longifolia*, *Marathrum foeniculaceum*, *M. plumosum*, *Mourera aspera*, *M. fluviatilis* e *Noveloa coulteriana*.

Nossos resultados corroboram com a localização dos corpos silicosos relatados na literatura para as seguintes espécies: *Apinagia richardiana* (SCHNELL, 1965), *Podostemum ceratophyllum* (WARMING, 1881), *P. scaturiginum* (WARMING, 1899), *Tristicha trifaria* (CARIO, 1881) e *Weddellina squamulosa* (WÄCHTER, 1897; KOI & KATO, 2007). Alguns de nossos resultados, no entanto, divergem dos mencionados na literatura. O estudo anatômico do eixo vegetativo de *Diamantina lombardii*, realizado por Rutishauser *et al.* (2005) e Costa *et al.* (2011), relatam a ocorrência de corpos silicosos na epiderme e subepiderme, porém observamos que nas folhas essas estruturas encontram-se restritas às células epidérmicas, assim concluímos que a disposição na subepiderme se deve a inclusão de caule na análise. Mello *et al.* (2011), em trabalho de cunho taxonômico, tratam erroneamente como “papilas” as emergências presentes na face adaxial de *Mourera aspera* e mencionam que essas estruturas são compostas por células silicosas. No entanto, Lopes (2012) em sua dissertação sobre a anatomia dos órgãos vegetativos, não constatou a presença dessas estruturas. Observamos corpos silicosos nas células que compõem as emergências e nas células do estrato subepidérmico dessa espécie e de *M. fluviatilis*.

4.3. Morfologia dos corpos silicosos

Em relação à forma, Schnell (1967) e Dickinson (2000) apontam que os corpos silicosos geralmente assumem o formato das células nas quais são acumulados, pois ocupam todo o volume intracelular (SOLEDER, 1908). Os resultados aqui expostos são congruentes com essa informação, uma vez que as formas mais alongadas foram detectadas nas células adjacentes ao feixe vascular, as quais possuem maior comprimento (*e.g.*: *Apinagia longifolia*). A forma poliédrica foi encontrada somente nas espécies que possuem corpos silicosos no tecido epidérmico (*e.g.*: *Cipoia inserta*). Na investigação anatômica do eixo vegetativo, Costa *et al.* (2011) descreveram a forma dos corpos silicosos para *Diamantina*

lombardii (retangulares ou oblongos), *Tristicha trifaria* (retangulares) e *Weddellina squamulosa* (triangular, elipsoides, ovados ou oblongos). Algumas dessas informações divergem das expostas aqui para a lâmina foliar: *D. lombardii* apresentou corpos silicosos com forma poliédrica e retangular e *T. trifaria*, lobadas em “H” e retangular, o que pode ser observado nas ilustrações de Cario (1881). A causa de tal divergência é desconhecida, no entanto é possível que a forma poliédrica de *D. lombardii* tenha sido interpretada erroneamente como retangular. O formato dos corpos silicosos presentes nas folhas de *Podostemum scaturiginum* ilustrados em Warming (1899) corrobora com o encontrado nesse estudo. Apesar de Ameka *et al.* (2002) afirmarem que corpos silicosos de formatos similares estariam presentes em diversos táxons da família e que a forma retangular foi aqui encontrada em quase todos os táxons analisados, formas distintas encontradas em alguns táxons revelaram o sinal taxonômico e filogenético deste caráter, como será melhor abordado no tópico referente à evolução dos corpos silicosos (4.6).

Solereder (1908) indica que a superfície dos corpos silicosos pode apresentar-se lisa, espiralada (crenada), exibir numerosas ondulações ou perfurações. Além destes tipos, encontramos superfície granulosa, presente em espécies dos gêneros *Apinagia*, *Marathrum* e *Oserya*; e verrugosa em *Mourera*. Corpos silicosos com superfície crenada, semelhantes aos aqui reportados para *Tristicha trifaria* têm sido encontrados em diversas análises paleoecológicas de sedimentos e referenciados genericamente como pertencentes à família Podostemaceae (ERRA, 2010; GARNIER *et al.*, 2013; KENNETT *et al.*, 2005). De acordo com Warming (1899), a diversidade de ornamentação deve-se à influência de organelas celulares como o núcleo, cloroplastos e grãos de amido, no que discordamos, pois as evidências aqui relatadas nos levam a supor que este é um caráter determinado pela história evolutiva da família. A epiderme foi a região histológica na qual foram detectados corpos silicosos com a maior diversidade de ornamentação; com superfície crenada, ondulada, perfurada ou lisa. O lúmen foi encontrado somente na superfície de corpos silicosos desta região histológica. Corroboramos com a ornamentação descrita para os corpos silicosos de *Diamantina lombardii* de Costa *et al.* (2011), no entanto esses autores interpretaram a estrutura central circular como uma perfuração e não como um lúmen. Algumas das ornamentações aqui observadas também são encontradas em representantes

paleotropicais, como a ondulada para *Polypleurum minus* (JÄGER-ZÜRN, 2011) e a perfurada para duas espécies de *Saxicollela* Engl. (AMEKA *et al.* 2002).

4.4. Análise estatística dos corpos silicosos

O único registro para o tratamento estatístico de corpos silicosos é o de Costa *et al.* (2011), que analisaram um representante para cada um dos seguintes táxons: *Diamantina lombardii*, *Tristicha trifaria* e *Weddellina squamulosa*. Dentre eles, somente as médias de comprimento e largura de *T. trifaria* são divergentes das medidas dos espécimes aqui analisados. Essa diferença deve-se, provavelmente, ao fato de que a média calculada pelo estudo mencionado se refere ao eixo vegetativo, sem distinção entre caule e folha, o que provavelmente incluiu medidas de corpos silicosos oriundos do caule, que possuem dimensões maiores.

Em diversas amostras o desvio padrão do comprimento e/ou da largura equivale a mais do que 20% do valor da média correspondente, denotando a heterogeneidade da amostra. Os corpos silicosos encontrados nos tecidos epidérmico e subepidérmico apresentaram, em geral, comprimento menor do que aqueles presentes nas células adjacentes ao feixe vascular; o que se justifica pela mesma relação de tamanho entre essas células. Não foi possível detectar padrões através das médias do comprimento e da largura que pudessem diferenciar os táxons analisados em nível genérico ou específico.

As diferenças intraespecíficas observadas através do teste de Kruskal-Wallis indicam que o tamanho dos corpos silicosos estaria direta e/ou indiretamente sujeito a fatores extrínsecos, tornando esse caráter inapropriado para o uso taxonômico e consequentemente filogenético.

4.5. Evolução dos corpos silicosos

A presença e a ausência de corpos silicosos mostraram-se constantes em clados e gêneros cuja monofilia é sustentada por sinapomorfias morfológicas (e.g. *Castelnavia*; PHILBRICK *et al.*, 2009) e moleculares (Tippery *et al.*, 2011). *Apinagia*

e *Marathrum* foram os únicos gêneros a apresentarem espécies com e sem corpos silicosos as quais se encontram posicionadas em clados distintos. Tal observação é congruente com a hipótese de polifiletismo para esse gênero proposta por Tippery *et al.* (2011). É interessante notar que o clado fortemente suportado por dados moleculares, mas sem sinapomorfias morfológica até o momento, e morfologia externa muito diversa, que reúne os gêneros *Lophogyne*, *Monostylis*, *Jenmaniella* e apenas uma das espécies de *Apinagia* e *Marathrum* (Clado J; Tippery *et al.*, 2011) compartilham deste caráter apomórfico, apesar de não exclusivamente. Essas informações corroboram a hipótese Jäger-Zürn (2011) de que a capacidade de absorver e acumular cristais de sílica, assim como a ausência dessa habilidade pode ser considerada um caráter de valor evolutivo. A transformação dos estados do caráter “Corpos silicosos” de presente para ausente e vice-versa, como aqui observado para a família Podostemaceae, foi igualmente relatada em famílias da ordem Commelinales por Prychid *et al.* (2003b). Considerando que a ausência de relatos de corpos silicosos para o grupo irmão de Podostemaceae, Hypericaceae, seja o reflexo da ausência destas estruturas e não de investigação, a presença de sílica constitui uma sinapomorfia para a família; a perda destas estruturas nos clados intermediários (nem basais nem apicais) de *Podostemoideae* é também uma sinapomorfia.

Corpos silicosos restritos à epiderme foram encontrados em *Tristichoideae*, *Weddellinoideae* e no clado paleotropical de *Podostemoideae*, o que nos levou a concluir que esse é o estado plesiomórfico para a família. Apesar da localização de corpos silicosos na subepiderme e/ou em células adjacentes aos feixes vasculares serem estados frequentemente compartilhados nos terminais, sua análise independente mostra um forte sinal filogenético em nível específico para os gêneros *Apinagia* e *Mourera*, assim como corroborando a recente distinção entre os gêneros *Noveloa* e *Oserya* (TIPPERY *et al.*, 2011).

Por ocuparem quase completamente o volume intracelular, pode considerar-se que a forma dos corpos silicosos esteja diretamente relacionada ao formato da célula. Apesar de Ameka *et al.* (2002) afirmarem que seria improvável a aplicação do formato dos corpos silicosos como caráter taxonômico, nossos resultados apontam que esse caráter é taxonômico e filogeneticamente informativo. Embora a forma lobada tenha sido encontrada exclusivamente em *Tristicha trifaria*, é necessária a

investigação deste caráter tanto nas demais espécies do gênero como nos demais gêneros da subfamília para se concluir em que nível este caráter pode se constituir em uma autapomorfia, sinapomorfia ou, até mesmo, uma plesiomorfia.

A ornamentação dos corpos silicosos foi um dos caracteres mais informativos desta análise, dada a sua diversidade e distribuição no cladograma. A estabilidade e exclusividade dos estados deste caráter para diversos gêneros também são marcantes. A superfície granulosa observada no clado *Oserya* (*Apinagia* + *Marathrum*) e a lisa, em *Noveloa coulteriana* (= *Oserya coulteriana*), corroboram com a recente mudança nomenclatural para este táxon (TIPPERY *et al.*, 2011). A estabilidade e exclusividade dos estados deste caráter para diversos gêneros são marcantes. A ornamentação crenada é encontrada exclusivamente em *Tristicha trifaria*, sendo necessária a investigação nas demais espécies do gênero e em outros gêneros da subfamília *Tristichoideae*. A presença de lúmen, condição detectada em *Diamantina* e no clado essencialmente paleotropical de *Podostemoideae* (*Ceratolacis* (*Cipoia* + *Podostemum*)), é também relatada para o gênero africano *Saxicolella* (Ameka *et al.*, 2002; Koi *et al.*, 2012). Tal observação pode indicar que este é um caráter de valor filogenético, agregando os táxons neo e paleotropicals inseridos neste clado, no entanto, são necessários estudos adicionais que corroborem essa hipótese.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo evidencia de maneira abrangente a diversidade de caracteres referentes aos corpos silicosos para os gêneros neotropicais da família Podostemaceae. Além de grande parte dos resultados obtidos serem inéditos, a associação destes com as recentes hipóteses filogenéticas possibilitaram traçar a história evolutiva de diferentes caracteres dos corpos silicosos para a família e sugerir novas apomorfias e sinapomorfias que auxiliam tanto no reconhecimento dos táxons como no suporte de diversos grupamentos monofiléticos.

A ausência de relatos de corpos silicosos para o clado dos clusióides indica que o surgimento dessas estruturas na família Podostemaceae constitui uma provável apomorfia na história evolutiva do clado, assim como o hábito reófito.

Os atributos quantitativos (comprimento e largura) dos corpos silicosos não se mostraram taxonômica ou filogeneticamente informativos.

Os atributos qualitativos dos corpos silicosos (presença, forma e ornamentação) apresentaram-se conservados em nível intraespecífico para os táxons analisados. Dentre os caracteres observados, presença-ausência, forma, ornamentação e formato do lúmen emergem como relevantes caracteres taxonômicos para a delimitação de diversos clados. O sinal filogenético específico para cada caso pode ser evidenciado pela congruência com as hipóteses filogenéticas. O atípico posicionamento de *Apinagia fimbriifolia* e de *Marathrum aerugisonum*, deslocados de seus congêneres, é corroborado pelos dados aqui levantados. A difícil distinção entre os gêneros *Apinagia* e *Marathrum* fica bem ilustrada nos cladogramas apresentados, evidenciando a necessidade da revisão taxonômica destes gêneros.

As técnicas empregadas, assim como os dados aqui obtidos poderão subsidiar uma ampla série de estudos. Dentre eles as análises paleobotânicas, uma vez que os corpos silicosos podem resistir a condições adversas nas quais outros tipos de registros (e.g. grãos de pólen) não resistem, além de refletir a flora precedente de maneira mais localizada. Com os tipos morfológicos em mãos será possível detectar a presença de rios pretéritos, assim como indicar quais táxons ocorriam na localidade.

O possível papel fisiológico e as consequências ecológicas associadas à presença de corpos silicosos nas espécies analisadas são questões que permanecem em aberto. Certamente a ocupação de um hábitat tão singular e inconstante influenciou diretamente no desenvolvimento de diversas peculiaridades morfológicas e anatômicas em Podostemaceae, como os corpos silicosos. São necessários estudos adicionais a fim de corroborar a aplicabilidade desse caráter em nível infragenérico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTION: Ver. 2.6 Build 366, Action software, 2013. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/en/886-about-action> (Acessado em 11/07/2014).
- ALEXANDRE, A.; MEUNIER, J.D.; LÉZINE, A.M. & SCWARTZ, D. Phytoliths: indicators of grassland dynamics during the late Holocene in intertropical Africa. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, v. 136, p. 213-229, 1997.
- AMEKA, G.K. The morphology, taxonomy and distribution of the Podostemaceae in West Africa. *West African of Applied Ecology*, v. 4, p. 49-66, 2003.
- AMEKA, G.K.; PFEIFER, E. & RUTISHAUSER, R. Developmental morphology of *Saxicolella amicorum* and *S. submersa* (Podostemaceae: *Podostemoideae*) from Ghana. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 139, n.3, p. 255-273, 2002.
- AMEKA, G.K.; CLERK, G.C.; PFEIFER, E., & RUTISHAUSER, R. Developmental morphology of *Ledermanniella bowlingii* (Podostemaceae) from Ghana. *Plant Systematics and Evolution*, v. 237, n. 3, p.165-183, 2003.
- ANCIBOR, E. Anatomia de las species Argentinas de *Podostemum* Michaux, (Podostemaceae). *Parodiana*, v. 6, n. 1, p. 31-47, 1990.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 161, p. 105-121, 2009.
- ARBER, A. 1920. *Water Plants: a study of Aquatic Angiosperm*. Cambridge: Cambridge University Press, 436p.
- BELL, A.D. 1991. *Plant form: An illustrated guide to flowering plant morphology*. Oxford: Oxford University Press, 341 p.
- BERRY, P.E. & WIEDENHOEFT, A.C. *Micrandra inundata* (Euphorbiaceae), a new species with unusual wood anatomy from black-water river banks in southern Venezuela. *Systematic Botany*, v. 29, n.1, p. 125-133, 2004.
- BOVE, C.P. 2014. Podostemaceae. In: FORZZA, R.C. *et al. Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB194>>. Acesso em 20 Mar. 2014.
- BOVE, C.P. & PHILBRICK, C.T. (2010). Neotropical Podostemaceae. In: MILLIKEN, W.; KLITGÅRD, B. & BARACAT, A. *Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics*. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Podostemaceae.htm>>. Acesso em 20 Abr. 2014.
- CAMPOS, A. C. & LABOURIAU, L. G. Corpos silicosos de Gramineas dos Cerrados II. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 4, n. 1, p. 143-151, 1969.

- CARIO, R. Anatomische untersuchungen von *Tristicha hypnoides* Spreng. *Botanische Zeitung*, v. 39, p. 25-33, 1881.
- CAVALCANTE, P.B. Contribuição ao estudo dos corpos silicosos das Gramíneas amazônicas. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, v. 30, p. 1-38, 1968.
- COOK, C.D.K. & RUTISHAUSER, R. 2007. Podostemaceae. In: Kubitzki, K. *The families and genera of vascular plants*, v. 9. Berlin: Springer, 2007. p. 304-344.
- COSTA, F.G.C.M.; BOVE, C.P.; ARRUDA, R.C.O. & PHILBRICK, C.T. Silica bodies: little used characters in the systematics of Podostemaceae. *Rodriguésia*, v. 62, n. 4, p. 937-942, 2011.
- CUSSET, G. & CUSSET, C. Étude sur lês Podostemales: 10. Structures florales et vegetatives dês Tristichaceae. *Adansonia*, v. 10, p. 179-218, 1988.
- DICKISON, W.C. 2000. *Integrative plant anatomy*. San Diego: Academic Press, 533 p.
- ENGLER, A. 1930. Reihe Podostemales. In: ENGLER, A. & PRANTL, K. *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, 2. ed., v. 18a. Leipzig: Engelmann, 1930. p. 1-68.
- EPSTEIN, E. Silicon in plants: facts versus concepts. In: DATNOFF, L.E., SNYDER, G.H. & KORNDÖRFER, G.H. *Silicon in agriculture*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2001. p. 1-15.
- ERDTMAN, G. *Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms an introduction to palynology*. 2. ed. Stockholm: Almqvist & Wiksell, 1952. p.189-190. 451 p.
- ERRA, G. Asignación sistemática y paleocomunidades inferidas a partir del estudio fitolítico de sedimentos cuaternarios de Entre Ríos, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, v. 45, n. 3, 2010.
- FIGUEIREDO, R.C.L.; HANDRO, W. & FERRI, M.G. 1971. Corpos silicosos em gramíneas dos cerrados V. In: Ferri, M.G. *III Simpósio sobre o cerrado*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. p. 215-231.
- FINER, M & JENKINS, C.N. Proliferation of hydroelectric dams in the Andean Amazon and implications for Andes-Amazon connectivity. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, 2012.
- FRANKLIN, G.L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature*, v. 155, p. 51, 1945.
- FUJINAMI, R.; YOSHIHAMA, I. & IMAICHI, R. Dimorphic chloroplasts in the epidermis of Podostemoideae, a subfamily of the unique aquatic angiosperm family Podostemaceae. *Journal of plant research*, v. 124, p. 601-605, 2011.
- GARNIER, A., NEUMANN, K., EICHHORN, B., & LESPEZ, L. Phytolith taphonomy in the middle-to late-Holocene fluvial sediments of Ounjougou (Mali, West Africa). *The Holocene*, v. 23, n. 3, 2013.

- GERRITS, P. O. & SMID, L. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy*, v. 132, p. 81-85, 1983.
- HAMMOND, B.L. Development of *Podostemon ceratophyllum*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, v. 64, n. 1, p. 17-36, 1936.
- HODSON, M. J., WHITE, P. J., MEAD, A. & BROADLEY, M.R. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annals of Botany*, v. 96, n. 6, p. 1027-1046, 2005.
- HORVATH, T.G. Retention of particulate matter by macrophytes in a first-order stream. *Aquatic Botany*, v. 78, p. 27-36, 2004.
- JÄGER-ZÜRN, I. Neglected features of probable taxonomic value in Podostemaceae: The case of *Polypleurum*. *Flora*, v. 206, p. 38-46, 2011.
- JÄGER-ZÜRN, I. & GRUBERT, M. Podostemaceae depend on sticky biofilms with respect to attachment to rocks in waterfalls. *International Journal of Plant Sciences*, v. 161, p. 599-607, 2000.
- JOHANSEN, D.A. *Plant Microtechnique*. New York: Mc-Graw Hill, 1940. 523 p.
- KATAYAMA, N.; KATO, M.; NISHIUCHI, T. & YAMADA, T. Comparative anatomy of embryogenesis in three species of Podostemaceae and evolution of the loss of embryonic shoot and root meristems. *Evolution & Development*, v. 13, n. 4, p. 333-342, 2011.
- KEALHOFER, L. & PIPERNO, D.R. Opal phytoliths in southeast Asian flora. *Smithsonian Contributions to Botany*, v. 88, p. 1-39, 1998.
- KENNETT, D.J.; PIPERNO, D. R.; JONES, J.G.; NEFF, H.; VOORHIES, B.; WALSH, M.K. & CULLETON, B.J. Pre-pottery farmers on the Pacific coast of southern Mexico. *Journal of Archaeological Science*, v. 37, n. 12, p. 3401-3411, 2010.
- KITA, Y. & KATO, M. Intrafamilial phylogeny of the aquatic angiosperm Podostemaceae inferred from the nucleotide sequences of the *matK* gene. *Plant Biology*, v. 3, n. 2, p. 156-163, 2001.
- KOI, S. & KATO, M. Developmental morphology of the shoot in *Weddellina squamulosa* and implications for shoot evolution in the Podostemaceae. *Annals of Botany*, v. 99, n. 6, p. 1121-1130, 2007.
- KITA, Y.; HIRAYAMA, Y.; RUTISHAUSER, R.; HUBER, K. A. & KATO, M. Molecular phylogenetic analysis of Podostemaceae: implications for taxonomy of major groups. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 169, n. 3, p. 461-492, 2012.
- KRUSKAL, W. H., & WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952.

- LANGANI, F. & MOREIRA, C.R. *Hemiodus iratapuru*, a new species of hemiodontidae from the Rio Jari, Amazon basin, Brazil (Teleostei, Characiformes). *Journal of Fish Biology*, v. 82, p. 1259-1268, 2013.
- LINDLEY, J. 1833. *Nixus Plantarum*. London: Rightway et Filios, 1833. 28 p.
- LOPES, E.F.M. *Anatomia dos órgãos vegetativos do gênero Podostemum MICHX sensu stricto e grupos externos (Podostemoideae, Podostemaceae)*. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2012.
- LU, H. & LIU, K. Phytoliths of common grasses in the coastal environment of southeastern USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 58, p. 587-600, 2003.
- MA, J.F. & YAMAJI, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science*, v. 11, n. 8, p. 392-397, 2006.
- MADELLA, M.; ALEXANDRE, A. & BALL, T. International code for phytolith nomenclature 1.0. *Annals of Botany*, v. 96, n. 2, p. 253-260, 2005.
- MADDISON, W.P.; & MADDISON, D.R. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis, version 2.75. Disponível em: http://mesquiteproject.org/Mesquite_Folder/docs/mesquite/manual.html. Acesso em 02 Abr. 2014.
- MATHEW, C.J., JÄGER-ZÜRN, I., & NILEENA, C.B. *Dalzellia gracilis*: a new species of Podostemaceae (*Tristichoideae*) from Kerala, India. *International Journal of Plant Sciences*, v. 162, n. 4, p. 899-909, 2001.
- MELLO, A.S., TAVARES, A.S., & TREVISAN, R. Podostemaceae in southern Brazil. *Rodriguésia*, v. 62, n.4, p. 867-885, 2011.
- METCALFE, C.R., AND L. CHALK. 1950. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses, Vol. II*. Oxford: Clarendon Press, 1950. 564 p.
- NAGENDRAN, C.R., AREKAL, G.D., & SWAMY, B.G.L. Facultative stomata in *Griffithiella* (Podostemaceae). *Current Science*, v. 49, n. 14, p. 561.
- NOVELO, A. & PHILBRICK, C.T. *Vanroyenella*: A new genus of Podostemaceae from Jalisco, Mexico. *Systematic Botany*, v. 18, n. 1, p. 64-67, 1993.
- O'BRIEN, T.P; FEDER, N. & MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 49, p. 367-373, 1965.
- PANNIER, F. Physiological responses of Podostemaceae in their natural habitat. *International Revue der Gesamten Hydrobiologie*, v. 45, p. 347-354, 1960.
- PHILBRICK, C.T. & NOVELO, A. New world Podostemaceae: ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia*, v. 47, n. 2, p. 210-222, 1995.

- PHILBRICK, C.T.; NOVELO, A. & IRGANG, B.E. A new species of *Ceratolacis* (Podostemaceae) from Minas Gerais, Brazil. *Novon*, v. 14, n. 1, p. 108-113, 2004.
- PHILBRICK, C.T.; BOVE, C.P. & EDSON, T.C. Monograph of *Castelnavia* (Podostemaceae). *Systematic Botany*, v. 34, n. 4, p. 715-729, 2009.
- PHILBRICK, C.T.; BOVE, C.P. & STEVENS, H.I. Endemism in neotropical Podostemaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 97, n. 3, p. 425-456, 2010.
- PHILBRICK, C.T.; MALECKI, J.; TIPPERY, N.P. & STEVENS, H.I. A new genus of Podostemaceae from Venezuela. *Novon*, v. 21, n. 4, p. 475-480, 2011.
- PIPERNO, D.R. & PEARSALL, D.M. The silica bodies of tropical American grasses: morphology, taxonomy, and implications for grass systematics and fossil phytolith identification. *Smithsonian Contributions to Botany*, v. 85, p. 1-22, 1998.
- PRYCHID, C.J. & RUDALL, P.J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their Structure and systematic. *Annals of Botany*, v. 84, n. 6, p. 725-739, 1999.
- PRYCHID, C.J.; FURNESS, C.A. & RUDALL, P.J. Systematic significance of cell inclusions in Haemodoraceae and allied families: silica bodies and tapetal raphides. *Annals of botany*, v. 92, n. 4, p. 571-580, 2003b.
- PRYCHID, C.J.; RUDALL, P.J. & GREGORY, M. Systematics and biology of silica bodies in Monocotyledons. *The Botanical Review*, v. 69, p. 377-440, 2003a.
- ROYEN, P. The Podostemaceae of the New World. Part 1. Mededelingen van het Botanisch Museum en Herbarium van de Rijksuniversiteit te Utrecht, v. 107, p. 1-150, 1951.
- ROBERTS, B. Measure: Ver. 2.0 Build 158, C-Thing Software, 2004. Disponível em: <http://www.cthing.com/Measure.asp> (Acessado em 11/07/2014).
- RUHFEL, B.R.; BITTRICH, V.; BOVE, C.P.; GUSTAFSSON, M.H.G.; PHILBRICK, C.T.; RUTISHAUSER, R.; XI, Z. & DAVIS, C.C. Phylogeny of the clusoid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany*, v. 98, n. 2, p. 306-325, 2011.
- RURY, P. M. Systematic anatomy of *Erythroxyllum* P. Browne: Practical and evolutionary implications for the cultivated cocas. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 3, n. 2, p. 229-263, 1981.
- RUTISHAUSER, R. Developmental patterns of leaves in Podostemaceae with more typical flowering plants: saltational evolution and fuzzy morphology. *Canadian Journal of Botany*, v. 73, p. 1305-1317, 1995.
- RUTISHAUSER, R. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). *Aquatic Botany*, v. 57, p. 29-70, 1997.

- RUTISHAUSER, R. & GRUBERT, M. The architecture of *Mourera fluviatilis* (Podostemaceae). I. Mature structures and leaf development. *Botanica Helvetica*, v. 104, p. 179-194, 1994.
- RUTISHAUSER, R., & HUBER, K.A. The developmental morphology of *Indotristicha ramosissima* (Podostemaceae, *Tristichoideae*). *Plant Systematics and Evolution*, v. 178, n. 3, p. 195-223, 1991.
- RUTISHAUSER, R., PFEIFER, E., NOVELO, R.A. & PHILBRICK, C.T. *Diamantina lombardii* – an odd Brazilian member of the Podostemaceae. *Flora*, v. 200, n. 3, p. 245-255, 2005.
- RUTISHAUSER, R.; GROB, V. & PFEIFER, E. 2008. Plants are used to having identity crises. In: MINELLI, A. & FUSCO, G. *Evolving pathways. Key themes in evolutionary developmental biology*. Cambridge: Cambridge University, 2008. p. 194-213.
- SÁ-HAIAD, B.; TORRES, C.A.; ABREU, V.H.R.; GONÇALVES, M.R.; MENDONÇA, C.B.F.; SANTIAGO-FERNANDES, L.D.R.; BOVE, C.P. & GONÇALVES-ESTEVEZ, V. Floral structure and palynology of *Podostemum weddellianum* (Podostemaceae: Malpighiales). *Plant Systematics and Evolution*, v. 290, p. 141-149, 2010.
- SCHNELL, R. Études sur l'anatomie et la morphologie des Podostemacees. *Candollea*, v. 22, p. 157-225, 1967.
- SCHULZ, M.; KOZERSKI, H.P.; PLUNTKE, T. & RINKE, K. The influence of macrophytes on sedimentation and nutrient retention in the lower River Spree. *Water Research*, v. 37 p. 569-578, 2003.
- SERENO, P. C. Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics*, v. 23, n. 6, p. 565-587, 2007.
- SHAPIRO, S. S., & WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, n. 3, p. 591-611, 1965.
- SILVA, S. T. & LABOURIAU, L. G. Corpos silicosos de gramíneas dos Cerrados. III. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 5, n. 1, p. 167-182, 1970.
- SOLEREDER, H. 1908. *Systematic anatomy of the dicotyledons: a handbook for laboratories of pure and applied botany, Vol. II*. Oxford: Clarendon Press, 1908. 537p.
- STEUDE, H. 1935. Beiträge zur Morphologie und Anatomie von *Mourera aspera*. *Beihefte zum botanischen Centralblatt*, v. 53, p. 627-650.
- STRÖMBERG, C.A.E. Using phytolith assemblages to reconstruct the origin and spread of grass-dominated habitats in the great plains of North America during the late Eocene to early Miocene. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, v. 207, p. 239-275, 2004.

- TIPPERY, N.P.; PHILBRICK, C.T.; BOVE, C.P. & LES, D.H. Systematics and phylogeny of neotropical riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Systematic Botany*, v. 36, n. 1, p. 105-118, 2011.
- TULASNE, L.R. Podostemacearum monographia. *Archives du museum d'histoire naturelle*, v. 6, p. 1-208, 1852.
- TUR, N.M., 1987. Podostemaceae. Flora ilustrada de Entre Rios. *Colección Científica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, v. 6, p. 43-54.
- TUR, N.M. Taxonomy of Podostemaceae in Argentina. *Aquatic Botany*, v. 57, p. 213-241, 1997.
- WARMING, E. Familien Podostemaceae I. *Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter, Naturvidenskabelig og Matematisk Afdeling*, v. 2, p. 1-34, 1881.
- WARMING, E. Familien Podostemaceae III. *Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter, Naturvidenskabelig og Matematisk Afdeling*, v. 4, p. 443-514, 1888.
- WARMING, E. Familien Podostemaceae V. *Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter, Naturvidenskabelig og Matematisk Afdeling*, v. 9, p. 105-154, 1899.
- WÄCHTER, W. Beiträge zur Kenntniss einiger Wasserpflanzen. *Flora oder Allgemeine botanische Zeitung*, v. 83, p. 367-397, 1897.
- WELLE, B.J.H. On the occurrence of silica grains in the secondary xylem of the Chrysobalanaceae. *IAWA Bulletin*, p. 19-29, 1976.

APÊNDICE A – Lista de material examinado. Os materiais assinalados com * indicam os espécimes também analisados na filogenia de Tippery *et al.* (2011).

Apinagia corymbosa (Tul.) Engl. – **BRASIL. Mato Grosso:** Rio Pari, 15°36'10,5"S, 56°12'14,8"W, 17/VII/2006, *C.P. Bove et al. 1697** (R).

Apinagia fimbriifolia P. Royen – **BRASIL. Tocantins:** Prainha do Rio Novo, 10°15'38,5"S, 46°53'2,2"W, 15/VI/2010, *C.P. Bove et al. 2234* (R); Rio das Balsas, 11°1'3,5"S, 47°29'6,6"W, 27/VIII/2006, *C.P. Bove et al. 1741** (R); 11°1'5"S, 47°29'9,1"W, 4/VII/2013, *C.P. Bove et al. 2370* (R).

Apinagia fluitans P. Royen – **BRASIL. Mato Grosso:** Rio Aripuanã, 10°9'50,9"S, 56°27'12,8"W, 23/IX/2007, *C.P. Bove et al. 1896** (R).

Apinagia longifolia (Tul.) P. Royen – **BRASIL. Roraima:** Rio Branco, 1°35'45,1"N, 61°0'8,6"W, 08/VIII/2008, *C.P. Bove et al. 1950** (R); Rio Jauaperí, 0°28'55,1"N, 60°29'55"W, 07/VIII/2008, *C.P. Bove et al. 1943** (R); **Tocantins:** Rio Anauá, 1°08'18,7"N, 60°19'28,4"W, 14/VIII/2008, *C.P. Bove et al. 1975** (R).

Apinagia richardiana (Tul.) P. Royen – **BRASIL. Roraima:** Rio Caroebe, 0°52'28,1"N, 59°39'49,7"W, 13/VIII/2008, *C.P. Bove et al. 1972** (R); Rio Jauaperí, 0°28'55,1"N, 60°29'55,2"W, 07/VIII/2008, *C.P. Bove et al. 1945** (R); **Tocantins:** 10°18'13,2"S, 48°10'15,8"W, 27/VI/2013, *C.P. Bove et al. 2355* (R).

Apinagia riedelii Tul. – **BRASIL. Mato Grosso:** Rio Nobres, 14°41'52,9"S, 56°21'58,4"W, 25/VII/2003, *C.P. Bove et al. 1166* (R); **Minas Gerais:** Rio Jibóia, 16°6'1,5"S, 46°23'32,1"W, 21/VII/2009, *C.P. Bove et al. 2134* (R).

Apinagia staheliana (Went.) P. Royen – **BRASIL. Pará:** Rio São Benedito, 9°2'1,1"S, 56°38'24,3"W, 18/IX/2007, *C.P. Bove et al. 1869* (R).

Autana andersonii C.T. Philbrick – **VENEZUELA. Amazonas:** Rio Cuao, 5°02'39"N, 67°33'37"W, 07/II/2006, *C.T. Philbrick et al. 5867* (R,WCSU).

Castelnavia fluitans Tul. & Wedd. – **BRASIL. Mato Grosso:** Rio Apiacás, 9°19'11,9"S, 57°4'18,8"W, 21/IX/2007, *C.P. Bove et al. 1882* (R); **Pará:** 5°21'27"S, 48°47'27"W, 11/VI/2005, *C.P. Bove et al. 1498* (R); Rio Araguaia, 6°23'15,7"S, 48°32'9", 24/VI/2006, *C.P. Bove et al. 1726** (R); Rio Tocantins, 5°20'32"S, 48°46'9"W, 11/VI/2005, *C.P. Bove et al. 1514* (R).

Castelnavia monandra Tul. & Wedd. – **BRASIL. Pará:** Rio Araguaia, 5°20'32"S, 48°46'9"W, 12/VI/2005, *C.P. Bove et al. 1499* (R); 5°20'36"S, 48°52'51"W, 13/VI/2005, *C.P. Bove et al. 1585* (R); 05°18'28,5"S, 48°55'34,2"W, 22/VII/2006, *C.P. Bove et al. 1715* (R).

Castelnavia multipartita Tul. & Wedd. – **BRASIL. Goiás:** Rio São Patrício, 15°0'11"S, 49°24'51"W, 05/VI/2005, *C.P. Bove et al. 1473** (R); **Mato Grosso:** Rio Aripuanã, 10°9'58,0"S, 56°26'58,8"W, 23/IX/2007, *C.P. Bove et al. 1892* (R); **Pará:** Rio São Benedito, 9°03'11,5"S, 56°35'7,3"W, 18/IX/2007, *C.P. Bove et al. 1861* (R).

Castelnavia noveloi C.T. Philbrick & C.P. Bove – **BRASIL. Tocantins:** 10°18'13,2"S, 48°10'15,8"W, 27/VII/2013, *C.P. Bove et al. 2354* (R).

Castelnavia pendulosa (C.T. Philbrick & C.P. Bove) C.T. Philbrick & C.P. Bove – **BRASIL. Mato Grosso:** Rio Aripuanã, 14/VII/2007, *A.S. Tavares 980* (R); Rio Teles Pires, 9°21'1,8"S, 56°46'41"W, 19/VII/2007, *C.P. Bove et al. 1871** (R).

Castelnavia princeps Tul. & Wedd. – **BRASIL. Goiás:** Rio das Pedras, 13°52'26,3"S, 47°15'43,7"W, 28/VII/2009, *C.P. Bove et al. 2152* (R); **Mato Grosso:** Rio Nobres, 14°41'56,1"S, 56°2'56,4"W, 17/VII/2006, *C.P. Bove et al. 1700* (R); **Minas Gerais:** Espraiado do Gamarra, 9/IX/2006, *F.M. Ferreira 1123* (R).

Ceratolacis pedunculatum C.T. Philbrick, Novelo & Irgang – **BRASIL. Minas Gerais:** 45°16'37"S, 45°7'51,9"W, 08/VI/2010, *C.P. Bove et al. 2199* (R); **Pernambuco:** Rio São Francisco, 9°24'32"S, 40°28'53,1"W, 03/VII/2012, *C.P. Bove et al. 2334* (R); 9°21'43,7"S, 40°23'16,7"W, 03/VII/2012, *C.P. Bove et al. 2336* (R).

Cipoia inserta C.T. Philbrick, Novelo & Irgang – **BRASIL. Goiás:** Rio dos Couros, 14°9'38"S, 47°35'39"W, 11/VI/2010, *C.P. Bove et al. 2205* (R); 14°9'38"S, 47°35'39,1"W, 5/VII/2013, *C.P. Bove et al. 2374* (R); **Minas Gerais:** Rio São Francisco, 20°18'23"S, 46°31'23,3"W, 24/VI/2012, *C.P. Bove et al. 2317* (R).

Cipoia ramosa C.P. Bove, C.T. Philbrick & Novelo – **BRASIL. Goiás:** Rio das Pedras, 13°51'8,6"S, 47°27'1"W, 22/VI/2011, *C.P. Bove et al. 2299* (R); **Minas Gerais:** 17°43'33,4"S, 44°24'28,8"W, 21/VI/2010, *C.P. Bove et al. 2251* (R); Rio Corrente, 17°44'4,2"S, 44°21'55,9"W, 21/VII/2010, *C.P. Bove et al. 2254* (R).

Diamantina lombardii Novelo, C.T. Philbrick & Irgang – **BRASIL. Minas Gerais:** Cascatinha, 18°35'12,6"W, 43°25'48,4"W, 09/VI/2010, *C.P. Bove et al. 2201* (R); Rio do Peixe, 10/VI/2009, *C.P. Bove et al. 2131* (R); Serra do Cabral, 17°44'4,2"S, 44°21'55,9"W, 21/VI/2010, *C.P. Bove et al. 2253* (R).

Jenmaniella ceratophylla Engl. – **BRASIL. Pará:** Rio São Benedito, 9°03'11,5"S, 56°35'7,3"W, 18/IX/2007, *C.P. Bove et al. 1866** (R).

Jenmaniella fimbriata P. Royen – **BRASIL. Tocantins:** Rio Taquaruçu, 10°18'18"S, 48°10'31"W, 09/VI/2005, *C.P. Bove et al. 1489** (R); **SURINAME. Sipaliwini:** Rio Suriname, 4°15'45,4"N, 55°25'24,2"W, 29/X/2007, *C.T. Philbrick et al. 6229* (R, WCSU); **VENEZUELA. Amazonas:** Rio Ventuari, 4°0'22,7"N, 66°58'53,8"W, *C.T. Philbrick et al. 6314** (R, WCSU).

Lophogyne lacunosa (Gardner) C.P. Bove & C.T. Philbrick – **BRASIL. Bahia:** Barraginha, 13°36'56,8"S, 41°49'10,5"W, 28/VI/2012, *C.P. Bove et al. 2324* (R); **Minas Gerais:** Cachoeira Escura, 19°19'45,8"S, 42°22'26,1"W, 23/VI/2010, *C.P. Bove et al. 2258* (R); **Rio de Janeiro:** Ribeirão do Sana, 22/II/2003, *C.P. Bove et al. 1111* (R); Rio Sana, 06/VII/2003, *C.P. Bove et al. 1131* (R); Aldeia Velha, 22°26'7,7"S, 42°17'7,1"W, 13/VIII/2010, *C.P. Bove et al. 2264* (R).

Marathrum aeroginosum P. Royen – **SURINAME. Sipaliwini:** Rio Suriname, 4°01'41"N, 55°27'43"W, 22/X/2007, *C.T. Philbrick et al. 6214** (R, WCSU); 4°17'59,4"N, 55°25'1,7"W, *C.T. Philbrick et al. 6231* (R, WCSU); **VENEZUELA. Amazonas:** Confluência dos Rios Orinoco e Ventuari, 3°57'35"N, 67°05'54"W, 06/III/2009, *C.T. Philbrick et al. 6309** (R, WCSU).

Marathrum foeniculaceum Humb. & Bonpl. – **MÉXICO. Jalisco:** Rio Horcones, 18/XI/2005, *C.P. Bove et al. 1627* (R); Rio Las Huntas, 19/XI/2005, *C.P. Bove et al. 1630* (R).

Marathrum plumosum (Novelo & C.T. Philbrick) C.T. Philbrick & C.P. Bove – **MÉXICO. Jalisco:** Rio Horcones, 18/XI/2005, *C.P. Bove et al. 1629* (R).

Marathrum tenue Liemb – **COSTA RICA. San Jose:** Rio Chirripó Pacífico, 9°26'01"N, 83°11'13", 22/III/2006, *Philbrick et al. 5926**; 9°50'16"N, 84°11'13"W, 22/III/2006, *Philbrick et al. 5957**.

Marathrum utile Tul. – **VENEZUELA. Zulia:** Yaza River, 10°02'54"N, 72°42'57"W, 13/II/2006, *Philbrick et al. 5886** (VEN, WCSU).

Monostylis capillacea Tul. – **BRASIL. Goiás:** 13°42'28,9"S, 47°14'13,4"W, 13/VI/2010, *C.P. Bove et al. 2220* (R); Rio Paranã, 13°42'28,3"S, 47°14'11,2"W, 28/VII/2009, *C.P. Bove et al. 2151* (R); **Mato Grosso:** Rio Aripuanã, 10°9'50,9"S, 56°27'12,8"W, 23/X/2007, *C.P. Bove et al. 1898** (R); **Tocantins:** Rio Lajeado, 9°50'9"S, 48°17'38"W, 07/VI/2005, *C.P. Bove et al. 1479** (R).

Mourera aspera Tul. – **BRASIL. Minas Gerais:** Rio Doce, 19°19'45,8"S, 42°22'26,1"W, 23/VI/2010, *C.P. Bove et al. 2260* (R); Rio São Francisco, 17°21'22,2"S, 44°56'54,1"W, 24/VII/2011, *C.P. Bove et al. 2304* (R); **Rio de Janeiro:** Rio Macabú, 20/XII/2002, *C.P. Bove et al. 1080* (R); Rio Quilombo, 24/VI/2004, *C.P. Bove et al. 1343* (R).

Mourera elegans Baill. – **BRASIL. Mato Grosso:** Rio Roosevelt, 9°9'52,1"S, 60°44'11"W, 25/X/2007, *C.P. Bove et al. 1899** (R); **Pará:** Rio Araguaia, 5°18'28,5"S, 48°55'34,2"W, 22/VII/2006, *C.P. Bove et al. 1713** (R); 5°18'28,3"S, 48°56'13,4"W, 22/VII/2006, *C.P. Bove et al. 1718* (R).

Mourera fluviatilis Aubl. – **BRASIL. Ceará:** Cachoeira do Boi Morto, 3°52'50,5"S, 41°0'47,6" W, 11/VI/2011, *C.P. Bove et al. 2289* (R); **Piauí:** Cachoeira do Urubu, 3°54'51,2"S, 42°6'46,4"W, 09/VI/2011, *C.P. Bove et al. 2285* (R); **Roraima:** Rio Jauaperí, 0°28'55,1"N, 60°29'55,2"W, 07/X/2008, *C.P. Bove et al. 1944* (R).

Mourera weddelliana Tul. – **BRASIL. Tocantins:** Rio das Balsas, 11°1'3,5"S, 47°29'6,6"W, 20/VII/2011, *C.P. Bove et al. 2297* (R); 11°1'3,5"S, 47°29'6,6"W, 27/VII/2006, *C.P. Bove et al. 1738** (R).

Noveloa coulteriana (Tul.) C.T. Philbrick – **MÉXICO. Jalisco:** Rio Horcones, 18/XI/2005, *C.P. Bove et al. 1628* (R); 22/XI/2005, *C.P. Bove et al. 1634* (R); Rio Las Huntas, 19/XI/2005, *C.P. Bove et al. 1631* (R).

Oserya perpusilla (Went.) P. Royen – **BRASIL. Bahia:** Rio de Contas, 13°3,4'14,8"S, 41°36'34,3"W, 29/VI/2012, *C.P. Bove et al. 2327* (R); **Roraima:** Rio Jauaperí, 07/X/2008, *C.P. Bove 1946** (R); 3°45'28,2"N, 60°59'50,2"W, 10/X/2008, *C.P. Bove et al. 1956* (R).

Podostemum ceratophyllum Michx, – **ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA.** **Tennessee:** 24/VIII/1981, *D.H. Webb* 4226 (R, WCSU); **Connecticut:** Chaplin, 30/VI/1995, *C.T. Philbrick et al.* 4634 (R, WCSU); **New York:** Rio Delaware, 03/VII/1995, *C.T. Philbrick et al.* 4639 (R, WCSU).

Podostemum scaturiginum (Mart.) C.T. Philbrick & Novelo – **BRASIL.** **Goiás:** Rio Padre Souza, 16°6'30,7"S, 49°1'50,6"W, 19/VI/2010, *C.P. Bove et al.* 2245 (R); **Paraná:** Cachoeirinha, 01/V/2007, *M.C.C. Moço* 47 (R); **Rio de Janeiro:** Poço Fundo, 09/IV/2002, *C.P. Bove et al.* 1030 (R).

Rhyncholacis applanata K.I. Goebel – **VENEZUELA.** **Bolivar:** Rio Paragua, 6°26'55,4"N, 63°32'7,2"W, 14/II/2007, *C.T. Philbrick & T.C. Edson* 6050 (R, VEN, WCSU); 6°18'7"N, 63°37'22"W, 14/II/2007, *C.T. Philbrick et al.* 6046* (R, VEN, WCSU).

Rhyncholacis penicillata Matthiesen – **VENEZUELA.** **Bolivar:** 5°58'2,3"N, 62°31'48"W, 16/II/2007, *C.T. Philbrick & T.C. Edson* 6057 (R. VEN. WCSU); Carrao River, 6°3'22,9"N, 62°38'11,2"W, 17/II/2007, *C.T. Philbrick & T.C. Edson* 6059 (R, VEN, WCSU); 6°14'48"N, 62°50'48"W, 18/II/2007, *C.T. Philbrick et al.* 6060* (VEN,WCSU).

Tristicha trifaria (Bory ex Willd.) Spreng. – **BRASIL.** **Bahia:** Rio Grande, 12°16'3,2"S, 45°1'49,1"W, 05/VI/2011, *C.P. Bove et al.* 2272 (R); **Maranhão:** Cachoeira Pedra Caída, 7°2'39,6"S, 47°26'28,7"W, 25/VI/2006, *C.P. Bove et al.* 1734 (R); **Piauí:** Rio Longá, 4°12'20,4"S, 42°14'23"W, 09/VI/2011, *C.P. Bove et al.* 2275 (R).

Weddellina squamulosa Tul. – **BRASIL.** **Bahia:** Rio Corrente, 13°20'23"S, 44°38'18,2"W, 08/VII/2012, *C.P. Bove et al.* 2350 (R); **Goiás:** Rio São Miguel, 14°16'40,2"S, 47°55'11,2"W, 04/VI/2009, *C.P. Bove et al.* 2042 (R); **Pará:** Rio São Benedito, 9°3' 11,5"S, 56° 35' 7,3"W, 18/IX/2007, *C.P. Bove et al.* 1862 (R).

APÊNDICE B – Protocolo de emblocamento em historesina utilizado para a análise do material em microscopia de campo claro

- 1- Fixação em FAA₇₀ (24 horas)
- 2- Álcool etílico 70% (1 hora)
- 3- Álcool etílico 90% (1 hora)
- 4- Álcool etílico 100% (1 hora)
- 5- Álcool etílico 100% (1 hora)
- 6- $\frac{2}{3}$ Álcool etílico 100% - $\frac{1}{3}$ Historesina (overnight)
- 7- $\frac{1}{2}$ Álcool etílico 100% - $\frac{1}{2}$ Historesina (6 horas)
- 8- $\frac{1}{3}$ Álcool etílico 100% - $\frac{2}{3}$ Historesina (overnight)
- 9- Historesina (6 horas)
- 10- Historesina acrescida de endurecedor para a produção de blocos (polimerização à temperatura ambiente e na presença de luz)

APÊNDICE C – Artigo referente à aplicação da acetólise para extração de corpos silicosos submetido para a Revista Review of Paleobotany and Palynology.

From: palbo-eo@elsevier.com
To: cpbove@hotmail.com
Date: Sat, 30 Nov 2013 07:19:32 +0000
Subject: PALBO2970: Notice of manuscript number

Dear Dr. Bove,

Your submission entitled "Application of acetolysis in phytoliths extraction" has been assigned the following manuscript number: PALBO2970.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on <http://ees.elsevier.com/palbo/> as Author.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Review of Palaeobotany and Palynology

Application of acetolysis in phytoliths extraction

Filipe G. C. M. da Costa^a, Pedro C. T. Souza^a, Denise E. Klein^b, Claudia P. Bove^{a,*}

^aDepartamento de Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro, 20940-040, Brasil.

^bDepartamento de Botânica, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Av. Pasteur, 458, Urca, Rio de Janeiro, 22290-240, Brasil.

Abstract

Phytoliths are inorganic particles derived from plants which can be applied in several areas such as plant taxonomy, systematic and paleontological studies. Dry and wet ashing are employed in phytoliths extraction from plant tissues and soil. Although they are both well established and widely applied in the phytolith morphological analysis, they are inefficient to fully remove the organic matter. To overcome this problem we evaluate the palynological method, acetolysis, to extract phytoliths. Leaf fragments of three species of the rheophytic family, Podostemaceae, were tested with two variables: temperature and time. The samples were analyzed in light and scanning electron microscopy. Our results indicate the efficacy of acetolysis in isolating phytoliths from plant material, providing a clear surface to the detailed analysis on its ornamentation.

Keywords: inorganic particles; biogenic silica; extraction protocol; phytolith; Podostemaceae; silica bodies

* Corresponding author. Tel. +55 21 21 25626950.

E-mail addresses: filipe_gomes88@yahoo.com.br (F.G.C.M.Costa), pedrocesarts@yahoo.com.br (P.C.T.Souza), klein_d_e@yahoo.com.br (D.E.Klein), cpbove@hotmail.com (C.P.Bove)

1. Introduction

Phytoliths or silica bodies are hydrated silicon dioxide particles ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), commonly known as biogenic silica, which precipitate and are deposited in the tissues of different organs in many groups of non-vascular and vascular plants (Williams, 1986; Epstein, 1999). Its morphology has been providing relevant insights to several areas, such as plant taxonomy and systematics, paleobotany and paleoclimatology (e.g. Prychid et al., 2004; Dickau et al., 2013). In order to access the phytolith morphology, the surrounding organic material must be dissolved or removed from the sample. Assorted techniques have been employed to expose or to extract phytoliths from plant tissues. These techniques are commonly grouped into two main categories: dry ashing and wet ashing (Rovner, 1983).

Dry ashing was the first method applied to detach phytoliths from the surrounding organic matter, by the French chemist Raspail (1839), in the analysis of *Spongilla*, a genus of freshwater sponge. Subsequently, several researchers have successfully employed this method to investigate the ash content of fossil (e.g. Netolitzky, 1914) and actual (e.g. Molisch, 1920) plants. The dry ashing technique basically applies high temperatures as a mean to oxidize organic material. The samples are placed in porcelain crucibles and ignited in a muffle furnace. Incineration temperatures are generally maintained between 450 °C and 900 °C (Jones and Handreck, 1967). A post-treatment with hydrochloridric acid (HCl) and nitric acid (HNO_3) may be required to remove residual material (Jones and Milne, 1963; Theunissen, 1994).

The wet ashing technique was proposed by Miliarakis (Miliarakis, 1884 apud Zimmermann, 1893), who used sulfuric acid and 20 % aqueous solution of chromic acid. Later, this technique has been widely recognized (Parry and Smithson, 1957; Jones and Milne, 1963; Rovner, 1972). Nowadays, different types of main oxidizing solutions have been used, such as nitric acid and perchloric acid (Rovner, 1971; Hayward and Parry, 1980) and sulphuric acid (Geiss, 1978). Samples may be pre-treated with hydrochloridric acid and/or post-treated with it or peroxide hydrogen (see Corbineau et al., 2013 for more details).

Albeit these two techniques and their variations (e.g. microwave digestion technique; Parr et al., 2001) are broadly applied to phytolith extraction, some researchers have reported few problems. Jenkins (2009) found higher abundance of conjoined phytoliths in samples treated by dry ashing than in samples treated by wet ashing. Moreover, wet ashing process can consume different amounts of time depending on the sample (Lu and Liu, 2003) or not even be fully efficient to digest the organic matter (Kameník et al., 2012).

Since the acetolysis method was introduced by Erdtman (1952, 1960), the patron of actuopalynology, it has been extensively used to the pollen analysis at light and electron microscopy. In essence, acetolysis involves heating pollen in a 9:1 solution of acetic anhydride ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$) and sulphuric acid (H_2SO_4), which dissolves all non-sporopollenin substances (cell contents and pollen kit), permitting the detailed investigation of the outer wall of plant spore and pollen grains.

Podostemaceae is an aquatic angiosperm family growing submerged on solid substrate (generally rocks) in fast-flowing water called riverweeds. Recently the phytoliths were considered taxonomic informative characters (Costa et al., 2011) and we are conducting a research to evaluate whether it can also be phylogenetically informative. Nonetheless, we have experienced some difficulties to apply the dry or wet ashing techniques to extract phytoliths because they become partially or entirely covered by organic matter, making it difficult to analyze them especially with scanning electron microscopy. To overcome this problem we aim to evaluate the efficacy of the acetolysis technique for the phytolith extraction from plant material.

2. Material and methods

Thirteen neotropical species distributed in nine genera of Podostemaceae were selected (Table 1). *Mourera fluviatilis* Aubl. was designated as model species to establish the protocol and the others species were used to verify its consistency.

Leaf fragments were fixed in FAA₇₀ and stored in 70% ethanol. The samples were air dried and acetolysed as proposed by Erdtman (1952). To identify the conditions required to produce clean-surface phytolith, we investigate two variables: temperature and time. Samples were acetolysed at room temperature (ca. 24°C) for 2 min., room temperature increasing up to 70°C for 2 min., 90°C for 1 min. and 100°C for 1 min. After obtained the temperature which has provided the clearest surface, we have increased the time to 5 and 10 minutes in order to verify its influence in the dissolution of the residual organic matter. For light microscopy (LM) analysis, samples were mounted in glycerin jelly (according to Kissler, 1935 apud Erdtman, 1952) and observed at 400x and 1000x magnification. Images were captured on an Olympus BX-51 microscope with the image-capture Q-color5 and Image-Pro Express software. For scanning electron microscope (SEM), samples were placed on aluminium stubs, sputter-coated with gold-palladium and examined on a Jeol JSM-5800, operating at 15 kV.

3. Results

The acetolysed leaf fragments of the model species, *Mourera fluviatilis*, showed the following results regarding to the temperature. At room temperature phytoliths can be detected but they remain almost entirely covered by organic matter (Plate I, 1). At room temperature up to 70°C they become partially evident but their shape is still obscured (Plate I, 2). At 90°C some phytolith become partly exposed and organic matter becomes more fragmented (Plate I, 3). At 100°C they become better exposed but few portions of organic matter is still present (Plate I, 4). It is possible to observe a decrease of organic matter related to the elevation of temperature. Due to the better results obtained at 100°C, we elect this temperature to evaluate the influence in time on digestion of the organic matter. Both 5 and 10 minutes achieved an equally satisfactory result with the phytolith surface completely clean (Plate I, 1, 5, 6).

We applied the acetolysis method at 100°C for 5 minutes to the remaining species related in Table 1 and analyzed the results under LM and SEM (Plate II). Similar effects were obtained, except for *Cipoia inserta* and *C. ramosa* (Plate II, 3, 5). Both presented more organic matter than all other species analyzed; however, these debris were always disjoined from the phytoliths, not causing problems to their surface analyzes under SEM (Plate II, 2, 4, 6).

4. Discussion and conclusions

The purpose of our study was to evaluate the efficacy of the acetolysis method in phytolith extraction from plant material. Phytolith analysis is similar to pollen analysis considering that they both deal with biogenic structures of microscopic size (Rovner, 1983) and they can remain in substrata. As acetolysis method, microwave digestion (a wet ashing variation) was first suggested to pollen extraction (Jones, 1994) and later used to phytolith extraction by Parr et al. 2001. Phytoliths SEM analyses are sometimes performed without the application of extraction methods (e.g. Albuquerque et al., 2013), which can compromise shape and/or ornamentation study. When an extraction method is applied to SEM analysis, organic matter can persist in the samples (Theunissen, 1994), making the surface analysis difficult.

Compared to traditional methods, the phytolith extraction by acetolysis has some advantages: (1) fewer residues remain in the sample, providing a clear phytolith surface (2) less chemical substances are applied, providing a cheaper method (3) decreasing in the process time.

Despite the advantages produced by acetolysis, we strongly encourage the testing of this method in other taxonomic groups to corroborate (or not) its efficacy and possible adaptations.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Vânia L. Gonçalves-Esteves, Dr. Cláudia B. F. Mendonça and the team from the Laboratório de Palinologia (Museu Nacional-UFRJ) for the laboratory facilities where part of this study was done. Amanda Veiga for operating the SEM at Departamento de Invertebrados (Museu Nacional-UFRJ). This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) through master degree fellowship to F.G.C.M.C. and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Research Production Grant and PROTAX and REFLORA Projects to C.P.B. We thank the herbarium staff of the Museu Nacional (R) for allowing the study of their specimen.

References

Albuquerque, E.S.B., Braga, J.M.A., Vieira, R.C., 2013. Morphological characterisation of silica phytoliths in Neotropical Marantaceae leaves. *Plant Systematics and Evolution* 299 (9), 1659-1670.

- Corbineau, R., Reyerson, P.E., Alexandre, A., Santos, G. M., 2013. Towards producing pure phytolith concentrates from plants that are suitable for carbon isotopic analysis. *Review of Palaeobotany and Palynology* 197, 179-185.
- Costa, F.G.C.M., Bove, C. P., Arruda, R.C.O., Philbrick, C.T., 2011. Silica bodies and their systematic implications at the subfamily level in Podostemaceae. *Rodriguésia* 62 (4), 937-942.
- Dickau, R., Whitney, B.S., Iriarte, J., Mayle, F.E., Soto, J.D., Metcalfe, P., Street-Perrott, F.A., Loader, N.J., Ficken, K.J., Killeen, T. J., 2013. Differentiation of neotropical ecosystems by modern soil phytolith assemblages and its implications for palaeoenvironmental and archaeological reconstructions. *Review of Palaeobotany and Palynology* 193, 15-37.
- Epstein, E., 1999. Silicon. *Annual review of plant biology* 50(1), 641-664.
- Erdtman, G., 1952. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. *Almqvist & Wiksell, Stockholm* (533 pp.).
- Erdtman, G., 1960. The acetolysis method. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54, 561-564.
- Geis, J.W., 1978. Biogenic opal in three species of Gramineae. *Annals of Botany* 42(5), 1119-1129.
- Hayward, D.M., Parry, D.W., 1980. Scanning electron microscopy of silica deposits in the culms, floral bracts and awns of barley (*Hordeum sativum* Jess.). *Annals of Botany* 46(5), 541-548.
- Jenkins, E., 2009. Phytolith taphonomy: a comparison of dry ashing and acid extraction on the breakdown of conjoined phytoliths formed in *Triticum durum*. *Journal of Archaeological Science* 36(10), 2402-2407.
- Jones, R.A., 1994. The application of microwave technology to the oxidation of kerogen for use in palynology. *Review of Palaeobotany and Palynology* 80(3), 333-338.
- Jones, L.H.P., Handreck, K.A., 1967. Silica in soils, plants, and animals. *Advances in Agronomy* 19, 107-149.
- Jones, L.H.P., Milne, A.A., 1963. Studies of silica in the oat plant. I. Chemical and physical properties of the silica. *Plant and Soil* 18(2), 207-220.
- Kameník, J., Mizera, J., Řanda, Z., 2013. Chemical composition of plant silica phytoliths. *Environmental Chemistry Letters* 11, 189-195.
- Lu, H., Liu, K., 2003. Phytoliths of common grasses in the coastal environment of southeastern USA. *Estuarine, Coastal, and Shelf Science* 58, 587-600.
- Molisch, H., 1920. Aschenbild und Pflanzenverwandtschaft. *Sitzungsberichte Akademie der Wissenschaften* 129, 261-294.

Netolitzky, F., 1914. Die Hirse aus antiken Funden. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften 123, 725-750.

Parr, J.F., Dolic, V., Lancaster, G., Boyd, W.E., 2001b. A microwave digestion method for the extraction of phytoliths from herbarium specimens. *Review of Palaeobotany and Palynology* 116(3), 203-212.

Parry, D.W., Smithson, F., 1957. Detection of opaline silica in grass leaves. *Nature* 179, 975-976.

Prychid, C.J., Rudall, P.J., Gregory, M., 2004. Systematics and biology of silica bodies in monocotyledons. *The Botanical Review* 69(4), 377-440.

Raspail, F.V., 1839. *Nouveau système de chimie organique, fondé sur des méthodes nouvelles d'observation. Tome deuxième.* Baillière, Paris (492 pp.).

Rovner, I., 1971. Potential of opal phytoliths for use in paleoecological reconstruction. *Quaternary Research* 1, 343-359.

Rovner, I., 1972. Note on a safer procedure for opal phytolith extraction. *Quaternary Research* 2, 591.

Rovner, I., 1983. Plant opal phytolith analysis: major advances in archaeobotanical research. *Advances in Archaeological Method and Theory* 6, 225-266.

Theunissen, J.D., 1994. A method for isolating and preparing silica bodies in grasses for scanning electron microscopy. *Biotechnic & Histochemistry* 69(5), 291-294.

Williams, R.J.P. 1986. Introduction to silicon chemistry and biochemistry. In: Evered, D., O'Connor, M. (Eds.), *Silicon biochemistry: CIBA Foundation Symposium 121.* John Wiley & Sons, Sussex, pp. 24-39.

Zimmermann, A., 1893. *Botanical microtechnique.* Henry Holt and Company, New York (296 pp.).

Table 1. List of neotropical Podostemaceae species analyzed, respective vouchers and herbaria.

Species	Voucher (herbaria)
<i>Apinagia longifolia</i> (Tul.) P. Royen	<i>C. P. Bove et al. 1943</i> (R)
<i>Apinagia staheliana</i> (Tul.) P. Royen	<i>C. P. Bove et al. 1869</i> (R)
<i>Ceratolacis pedunculatum</i> C.T. Philbrick, Novelo &Irgang	<i>C. P. Bove et al. 2334</i> (R)
<i>Cipoia inserta</i> C.T. Philbrick, Novelo &Irgang	<i>C. P. Bove et al. 2317</i> (R)
<i>Cipoia ramosa</i> C.P. Bove, C.T. Philbrick &Novelo	<i>C. P. Bove et al. 2251</i> (R)
<i>Diamantina lombardii</i> Novelo, C.T. Philbrick, Novelo & Irgang	<i>C. P. Bove et al. 2131</i> (R)
<i>Mourera aspera</i> Tul.	<i>C. P. Bove et al. 2260</i> (R)
<i>Mourera fluviatilis</i> Aubl.	<i>C. P. Bove et al. 1944</i> (R)
<i>Noveloa coulteriana</i> (Tul.) C.T. Philbrick	<i>C. P. Bove et al. 1631</i> (R)
<i>Podostemum ceratophyllum</i> Michx.	<i>C. T.Philbrick et al. 4634</i> (R,WCSU)
<i>Podostemum scaturiginum</i> (Mart.) C.T.Philbrick & Novelo	<i>C. P. Bove et al. 2245</i> (R)
<i>Tristicha trifaria</i> (Willd.) Spreng.	<i>C. P. Bove et al. 1867</i> (R)
<i>Weddellina squamulosa</i> Tul.	<i>C. P. Bove et al. 1862</i> (R)

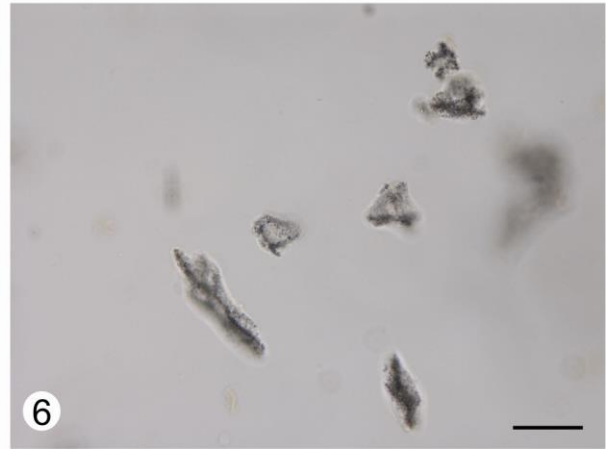
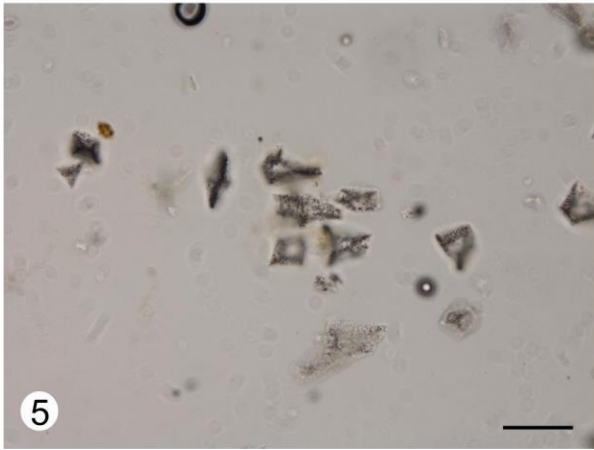
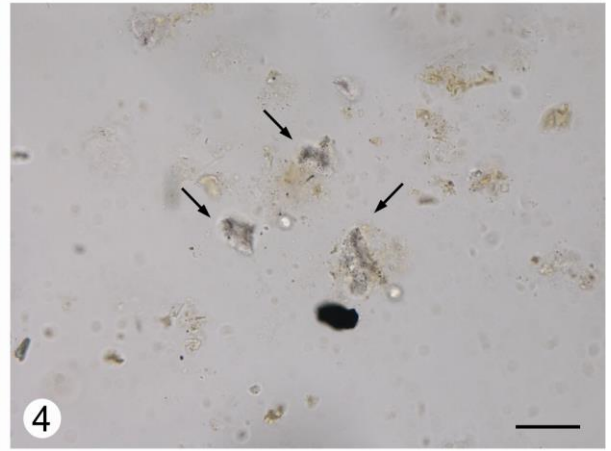
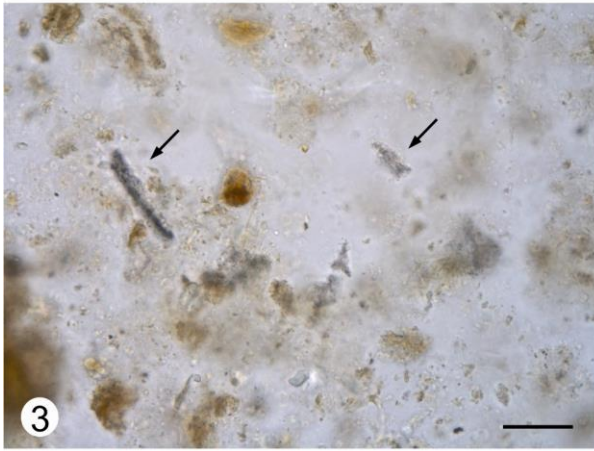
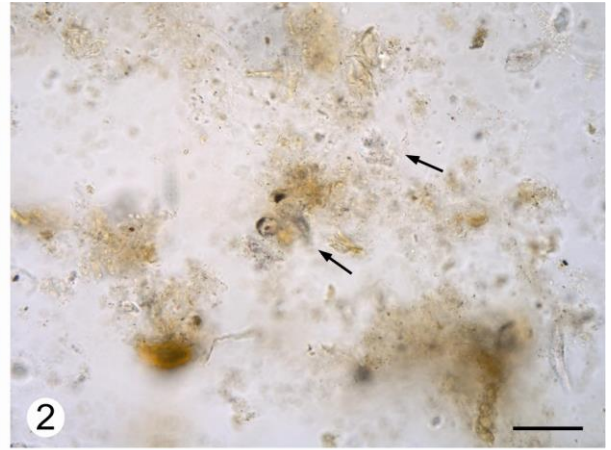
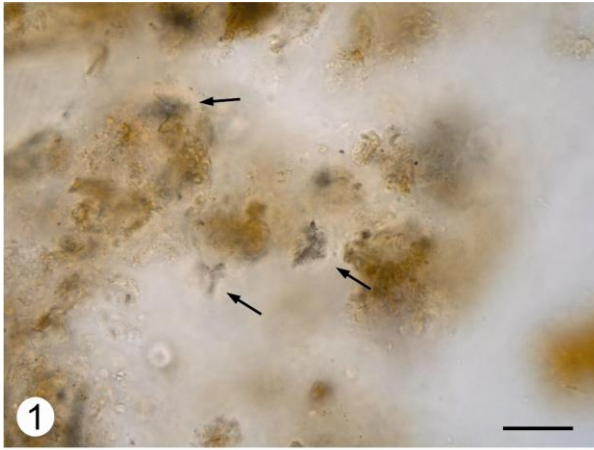


Plate I. Light microscopy of acetolysed samples of *Mourera fluviatilis* at different conditions of temperature and time. Arrows indicate phytoliths. Scale bar = 50 μm .

1. Room temperature for 2 minutes.
2. Room temperature up to 70°C.
3. 90°C for 1 min.
4. 100°C for 1 min.
5. 100°C for 5 min.
6. 100°C for 10 min.

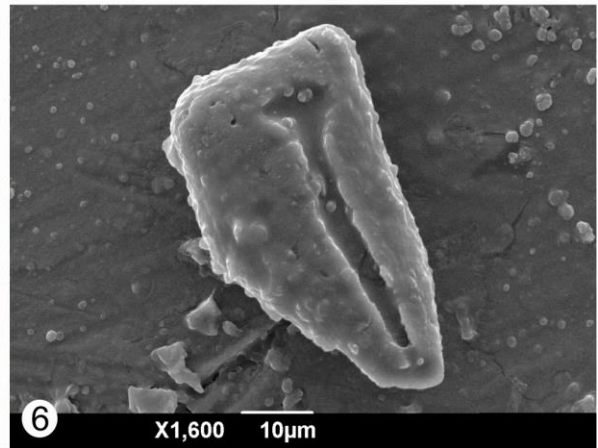
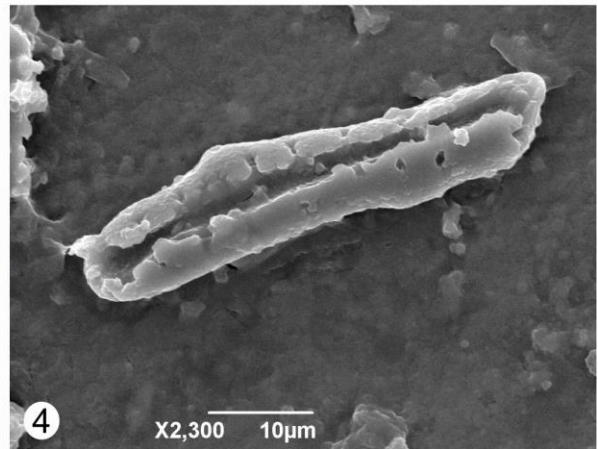
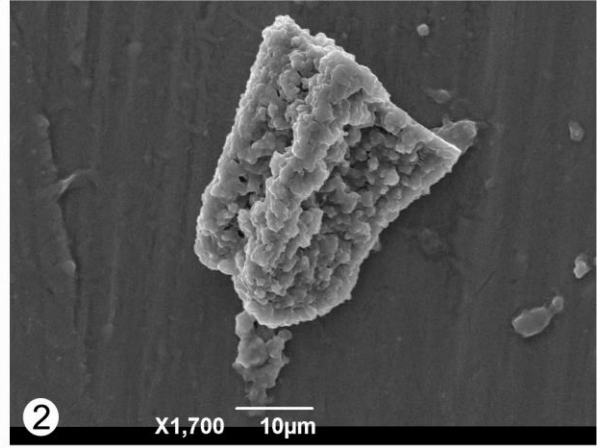
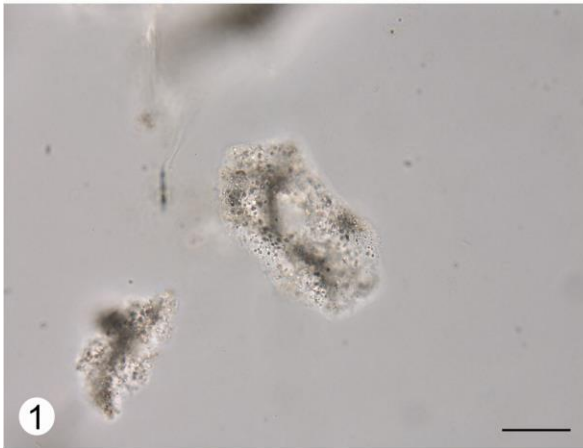


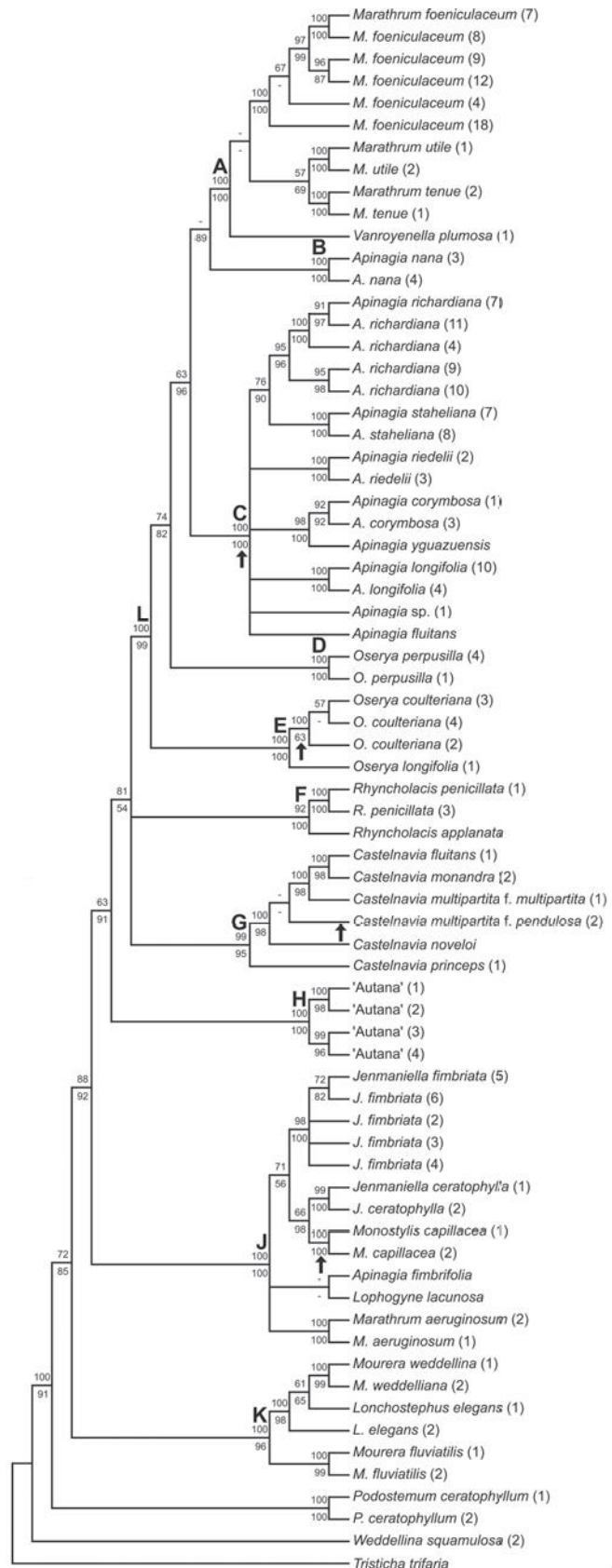
Plate II. Light and scanning electron microscopy of acetolysed phytoliths at 100°C for 5 min. samples. Scale bars =20 µm, except when mentioned.

1.-2. *Mourera fluviatilis*.

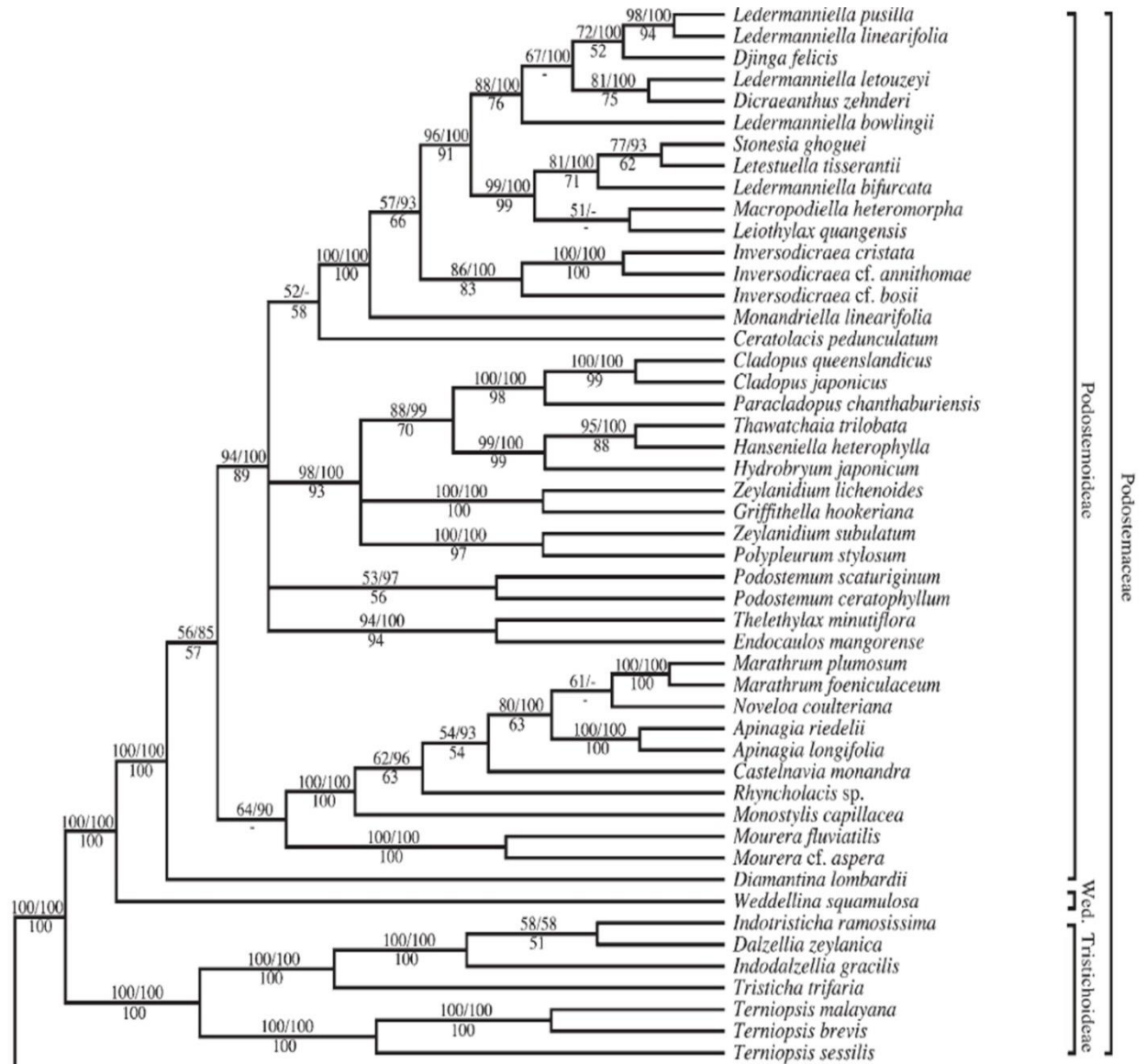
3.-4. *Cipoia inserta*.

5.-6. *Cipoia ramosa*.

ANEXO A – Cladograma de consenso estrito dos táxons neotropicais da família Podostemaceae obtido através de três marcadores moleculares (TIPPERY *et al.*, 2011)



ANEXO B – Fragmento de cladograma de consenso do clado dos clusióides obtido através de quatro marcadores moleculares (RUHFEL *et al.*, 2011)



ANEXO C – Cladograma dos táxons da família Podostemaceae obtido através do marcador molecular *matK* (KOI *et al.*, 2012)

