MORFOLOGIA FLORAL E VARIAÇÕES DE COLORAÇÃO EM PEÇAS FLORAIS DE *Pleroma granulosum* (DESR.) COGN (MELASTOMATACEAE)

Mariana Fernandes Rocha[1]; Verônica Rubim Apolônio[2,] & Thaisa Mara Miyamoto Martarelli[1]*

[1]Universidade Estadual de Maringá, PPG em Biologia Comparada, Maringá, PR, Brasil

[2]Universidade Estadual Paulista (UNESP), PPG em Biologia Vegetal, Rio Claro, SP, Brasil

*Autor correspondente: veronica.rubim@hotmail.com

Resumo

A quaresmeira (*Pleroma granulosum*), planta da família Melastomataceae, é espécie da Mata Atlântica, que possui flores com tonalidades que vão do rosa ao roxo, com grande potencial para ser utilizada como planta ornamental. A coloração da flor representa um dos atributos florais que pode indicar presença de recursos aos polinizadores. Nesse estudo, caracterizamos a flor de *Pleroma granulosum* quanto à sua morfologia e características reprodutivas. Em adição, investigamos se há variação no espectro ultravioleta, que seja perceptível ao polinizador, ao longo da senescência das flores de *P. granulosum.* Nos primeiros dias de amostragem, as anteras apresentaram coloração muito acentuada, que decaiu abundantemente em 24h, tornando a intensidade praticamente nula ao longo do último dia. Os resultados encontrados mostraram que as flores do 1º dia, após abertura, possuem uma curva de refletância UV maior que as de outras fases, indicando que a flor emite uma maior intensidade nas primeiras horas de sua abertura, e vai sequencialmente decaindo durante o período de sua antese. Nesse estudo foi possível elucidar que, de fato, há variação de espectro ultravioleta e diminuição da fluorescência de compostos nas anteras, durante a senescência floral.

Palavras-chave: Antera, Fluorescência, Polinização, Ultravioleta

Abstract

Pleroma granulosum, plant of the Melastomataceae, occurs in the Atlantic Forest, showing flowers with color ranging from pink to purple, with great potential to be used as ornamental. The color represents one of the floral attributes that can indicate the presence of resources to pollinators. In this study, we aimed to characterize the flower of *Pleroma granulosum* in terms of its morphology and reproductive features. In addition, we investigated whether there is variation in the ultraviolet spectrum, perceptible to the pollinator, during the floral anthesis. In the first days of sampling, the anthers showed very accentuated coloration, which declined abundantly in 24 hours, making the intensity practically null during the last day. The results showed that the flowers in the first day after opening have a greater curve of UV reflectance than those from other days, indicating that the flower, during the first hours of anthesis, emits greater intensity of UV reflectance and that decrease sequentially, according the period of anthesis. In this study, it was possible to elucidate that, in fact, there is variation in the ultraviolet spectrum and decrease in the fluorescence of compounds in the anthers, during the floral anthesis.

Keywords: Anther, Fluorescence, Pollination, Ultraviolet

Introdução

Melastomataceae tem distribuição quase exclusivamente tropical, sendo uma das grandes famílias das angiospermas, com aproximadamente 170 gêneros e cerca de 5105 espécies (MICHELLANGELI et al., 2013). No Brasil, é a sexta maior família de angiospermas e, com exceção da caatinga, ocorre em quase todos os biomas do país (ROMERO, 2000; CAMARGO, 2008; GOLDENBERG et al., 2012). Segundo Romero (2000), Melastomataceae é considerada uma família com caracteres morfológicos notórios em comparação a outras famílias, por exemplo, com inflorescência laterais, terminais e cimosas; a posição do ovário sendo ínfero, súpero ou semi-ínfero; fruto do tipo baga ou cápsula locucida (MARTINS, 2009). As folhas são geralmente opostas, simples, raramente verticiladas ou pseudoalternadas, apresentando três a várias nervuras primárias palmadas ou subpalmadas (WURDACK, 1962). A família é especialmente bem representada nas regiões neotropicais, sendo que nenhum gênero existe simultaneamente no Velho e no Novo Mundo.

Pleroma é um gênero neotropical composto por árvores, arbustos ou subarbustos com aproximadamente 350 espécies, distribuídas principalmente nas Américas. Estende-se desde o México e as Antilhas até o norte da Argentina, especialmente concentrado no sudeste do Brasil (COGNIAUX, 1885). A quaresmeira (*Pleroma granulosum* (Desr.) Cogn), espécie selecionada para estudo, ocorre tipicamente na Mata Atlântica, pode crescer até os 12m de altura e seu tronco pode atingir 40 cm de diâmetro (LORENZI, 1998). Apresenta flores com tonalidades que vão do rosa ao roxo, com grande potencial para ser utilizada como planta ornamental, principalmente em floração, por isso é recomendável em projetos paisagísticos, bem como na arborização de ruas estreitas e sob redes elétricas (LORENZI, 1998).

A coloração do perianto representa um dos variados atributos florais, que pode indicar presença de recursos aos polinizadores. Sabe-se que cerca de 78 famílias de angiospermas apresentam mudança de cor em suas flores; a maior parte dos estudos, no entanto, se limita a entender como essa variação intervém no comportamento de forrageio de insetos sociais em busca de pólen (MELO, 2017). Estudos, como o de Weiss (1991), mostraram que a mudança de cor age como um sinal sensorial na comunicação planta – polinizador (WAINWRIGHT et al., 1978; GORI, 1983; WEISS, 1991; FARZAD et al., 2002). Para as plantas, a alteração da cor pode funcionar como uma estratégia para garantir altas taxas de polinização cruzada, direcionando os polinizadores para flores que ainda não foram polinizadas, ou ainda pode tratar-se apenas do processo natural de senescência da flor (GORI, 1983).

Para os polinizadores, ao associarem a cor da flor com a disponibilidade de recurso, os visitantes aprendem a evitar flores sem recurso e, assim, buscar preferencialmente por flores de cor inalterada, aumentando sua eficiência de forrageio (CASPER & PINE ,1984; WEISS, 1991; LARSON & BARRETT, 1999). Para perceber os sinais das cores emitidos pelas plantas, as abelhas possuem receptores para três comprimentos de onda: ultravioleta (340 nm), azul (430 nm) e verde (540 nm) (RODRÍGUEZ-GIRONÉS & SANTAMARÍA, 2004). Os olhos das abelhas são compostos por mais de 12 mil unidades imóveis, chamadas de omatídeos, cada um com sua própria lente e conjunto de fotorreceptores. Dessa forma, elas enxergam melhor as flores amarelas, brancas, azuis e violetas (de acordo com a visão humana). No entanto, como elas enxergam o espectro ultravioleta (abaixo de 400 nm), as abelhas percebem as flores de forma diferente (MUXFELDT, 1987; CHITTKA & RAINE, 2006).

Embora as abelhas não possuam um receptor específico para a luz vermelha, esta cor não é totalmente invisível para elas (RODRÍGUEZ-GIRONÉS & SANTAMARÍA, 2004). Segundo esses autores, a luz vermelha acima de 650 nm é suficientemente intensa para sensibilizar o receptor verde e, dependendo da intensidade relativa entre as fontes de cor verde e vermelha, as abelhas podem ou não distinguir entre as flores vermelhas e a folhagem verde de fundo. Assim, as flores vermelhas são mais difíceis de serem detectadas pelas abelhas, provocando preferência por flores de cores mais acentuadas. Consequentemente, quanto menos tempo gasto para encontrar as flores, maior é a quantidade de flores visitadas (RODRÍGUEZ-GIRONÉS & SANTAMARÍA, 2004).

Nesse estudo, analisamos a flor de *Pleroma granulosum* quanto à sua morfologia e características reprodutivas. Em adição, investigamos se há variação no espectro ultravioleta, perceptível ao polinizador, durante a antese de *P. granulosum.*

Material e métodos

Área de estudo - O material analisado foi coletado no campus da Universidade Estadual de Maringá, durante os meses de fevereiro e março de 2020. O município de Maringá (Fig. 1) situa-se na região noroeste do Paraná, entre as coordenadas 23º15´15" e 23º33´27" de latitude sul e 51º50´05" e 52º05´59" de longitude oeste (BARROS et al., 2004). O clima predominante na região de Maringá, segundo a classificação de Köeppen (1936), é do tipo Cfa – subtropical úmido mesotérmico, definido geograficamente pelo traçado do trópico de Capricórnio, na sua região norte (MAACK, 1968). Maringá enquadra-se na região fitogeográfica denominada Floresta Estacional Semidecidual, segundo o Sistema Fisionômico-Ecológico de Classificação da Vegetação Brasileira, proposto por Veloso & Goes-Filho (1982).

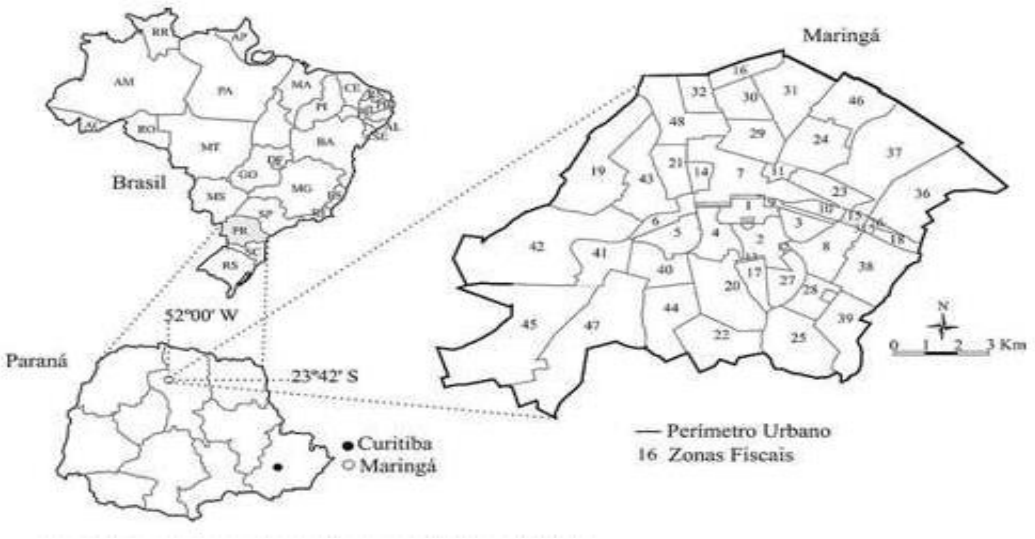

Figura 1. Localização da área de estudo

Análise morfológica - Botões florais e flores em antese foram descritas morfologicamente, com auxílio de microscópio estereoscópio e terminologia adotada por Souza (2009), no laboratório de histologia vegetal do departamento de biologia da Universidade Estadual de Maringá.

Refletância das anteras em diferentes fases florais e fotoperíodo - Para análise do espectro ultravioleta (100nm - 400nm) foram ensacados botões florais de três árvores (indivíduos) diferentes, localizadas no campus da Universidade Estadual de Maringá. Durante três dias, foram coletadas de duas a cinco anteras de uma flor de cada um dos três indivíduos por fotoperíodo (08h00 e 16h00, respectivamente), totalizando seis períodos amostrados.

As análises de fluorescência foram realizadas imediatamente após coleta, para que não ocorresse degradação de compostos e consequente perda de fluorescência. Foi utilizado microscópio com filtro UV. As flores também foram fotografadas ao longo dos três dias com câmera equipada com filtro UV, possibilitando a análise do espectro de visão do polinizador.

Os dados de refletância foram obtidos com uma câmera de imagem com sensor hiperespectral Headwall Photonics A-Series, com operação na região do visível e infra-vermelho próximo (Vis-NIR) entre 380-1000 nm e com resolução espectrorradiometrica de 0.74 nm e 825 bandas espectrais. Foram analisadas nove flores em cada fase da antese, totalizando 36. (A) antese primeiro dia (Fig. 2); (B) segundo dia da antese; (C) terceiro dia da antese; e (D) após senescência das anteras. Os resultados foram submetidos a testes

estatísticos ANOVA e Tukey nos softwares Microsoft Excel e PAST versão 4.01 para o comprimento de onda ultravioleta 380 nm. O sensor foi mantido a uma distância de 60 cm das flores para obtenção das imagens. As curvas padrões de ajuste e calibração do sensor foram ajustadas com uma placa padrão Spectralon. As imagens foram processadas individualmente utilizando o software ENVI 5.4 (Exelis Visual Information Solutions, Boulder, CO, USA), no Laboratório de Geoprocessamento e Sensoriamento Remoto Aplicado ao Meio Ambiente da Universidade Estadual de Maringá (UEM).



Figura 2. Flor de *Pleroma granulosum* no primeiro dia de amostragem.

Resultados e discussão

Análise morfológica

A antese de *Pleroma granulosum* ocorre pela manhã, ao amanhecer, por volta das 6h00, com duração total de 5 a 6 dias. A senescência da flor é evidenciada pelo esmaecimento da corola e escurecimento do androceu. Como esperado, *P. granulosum* possui peças florais de coloração roxa e rosa (Fig. 2), variando no indivíduo. As flores são pentâmeras (Fig. 3), com cinco sépalas, cinco pétalas, cinco carpelos e dez estames. Entretanto, foram observadas algumas flores contendo arranjos trímeros com seis peças em cada verticilo, exceção para os estames, os quais contabilizaram doze.

A flor é pedicelada, diclamídea, heteroclamídea e bissexual. Possui ovário ínfero, recoberto por hipanto repleto de tricomas (Fig. 3B), como esperado para o grupo (GUIMARÃES et al., 1999). Em adição, foram encontrados diversos tricomas no estilete quando botão, que desaparecem na antese (Figs. 4A-B).

As flores são dialissépalas, dialipétalas e dialistêmones, com ovário sincárpico pluricarpelar (Fig. 3B). Os estames estão dispostos em meia-lua na flor, em dois ciclos de estames com diferentes tamanhos. Leite (2016) discutiu que a espécie apresenta heteranteria e divisão da quantidade de pólen produzida. As anteras são falciformes e têm deiscência poricida, com pedoconectivo bem evidente, adaptações para a fixação do polinizador durante a polinização por vibração (BUCHMANN & HURLEY, 1978).

Quanto à ontogenia, observou-se que a inflorescência é coberta por uma bráctea, envolvendo três botões (Fig. 4-A). A disposição dos estames é curiosa quando botão, encontrando-se dobrados na região do conectivo com as anteras para o interior (Figs. 3A-B), alongando-se até o receptáculo ao longo da sua maturação (Fig. 5). As anteras são originalmente tetrasporangiadas e durante o desenvolvimento consomem o septo formando duas grandes tecas. As anteras, alinhadas ao processo de senescência, mudam sua cor do rosado para o roxo ou púrpura em 3 dias (Fig. 6), se destacando completamente da flor, a partir do quarto dia.

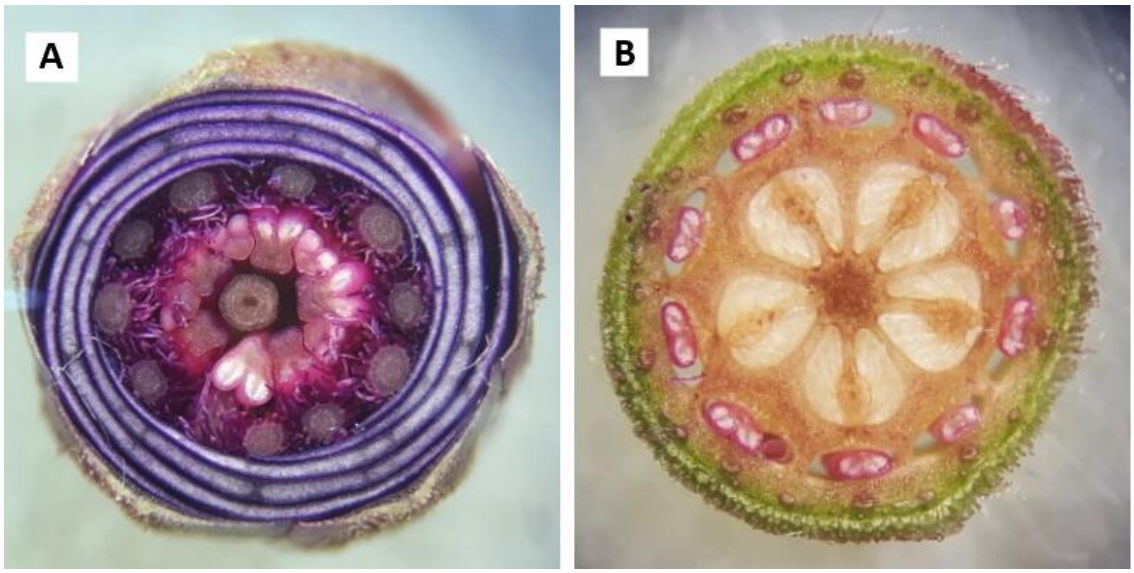

Figura 3. Botões florais de *Pleroma granulosum*, em cortes transversais executados em níveis diferentes. A. Região apical (androceu). B. Região basal (hipanto e ovário).

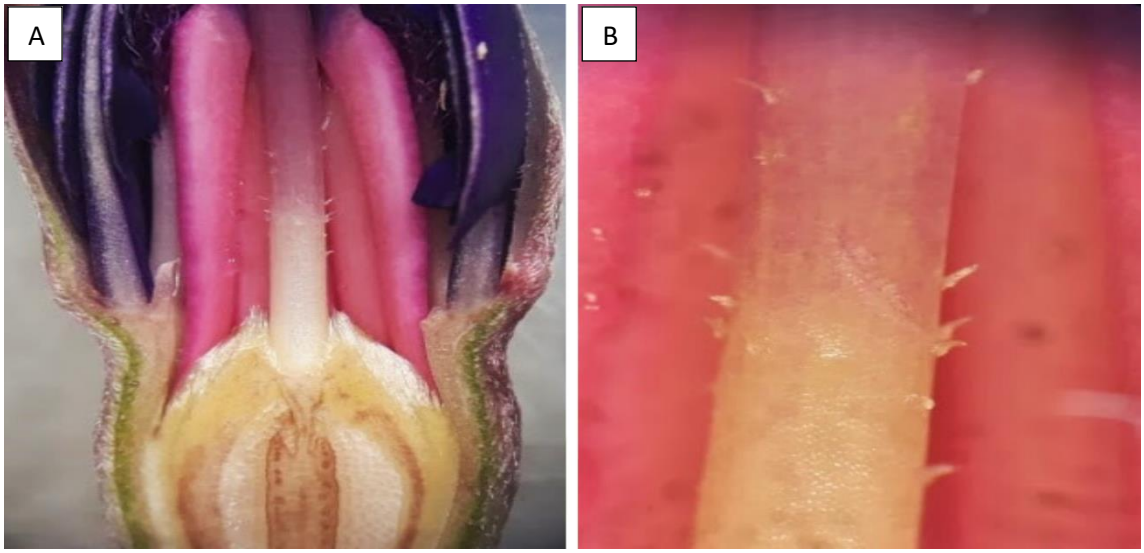

Figura 4. Botão floral em corte longitudinal. A. Vista geral. B. Detalhe do estilete mostrando tricomas.



Figura 5. Morfologia do botão floral. A. Inflorescência em corte longitudinal. B. botão floral em corte longitudinal.



Figura 6. Estames com anteras falciformes durante a antese. A. 1° dia. B. 2° dia. C. 3° dia.

Reflectância no espectro UV

Pleroma granulosum apresentou alteração de cor em suas pétalas (Fig. 7), indo da coloração roxa até a mais rosácea, conforme avançam os dias de sua senescência no espectro visível. O mesmo acontece com as suas anteras, como mencionado anteriormente (Fig. 6).

Abaixo dos 400 nm (Fig.7), todas as flores apresentam reflectância UV de 25 a 35%, possuindo variação entre as fases (ANOVA, $F=6.927$, $p>0.05$, $p=0.001$), sendo mais elevada na condição D e mais baixa na condição B, havendo diferença significativa (teste *t*, $t=0.0004$, $p>0.5$) nos estames, do segundo dia depois antese até o quarto dia. No espectro visível, momento em que as flores estão com coloração arroxeada (Condição B)

tornando-se rosadas (Condição D), supõe-se que devido à exposição solar e processos fisiológicos relacionados ao envelhecimento da flor, os pigmentos que ali existem se degradam, tornando as pétalas com coloração esmaecida e desbotada. Não houve diferença significativa entre as demais fases de senescência (teste-*t* A e B, *t*=0.140, p>0.05; B e C, *t*=0.055, p>0,05; A e D, *t*=0.115, p>0.05; A e C, *t*= 0.969, p>0.05; C e D, *t*=0.263, p>0.05) o que demonstra que a mudança de coloração é, de fato, gradualmente muito sutil de um dia para o outro.

No entanto, apesar de o último dia apresentar maior intensidade UV, de nada adianta para a polinização, pois nesta fase os estames, que contêm as recompensas florais, já não estão mais presentes na flor. Isso leva-nos a supor que a manutenção de flores antigas na árvore deve funcionar como um sinalizador a longas distâncias, como reportado por Brito et al. (2015) com as flores de *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. (Melastomataceae), interpretado como uma ilusão de "flor gigante" ao polinizador.

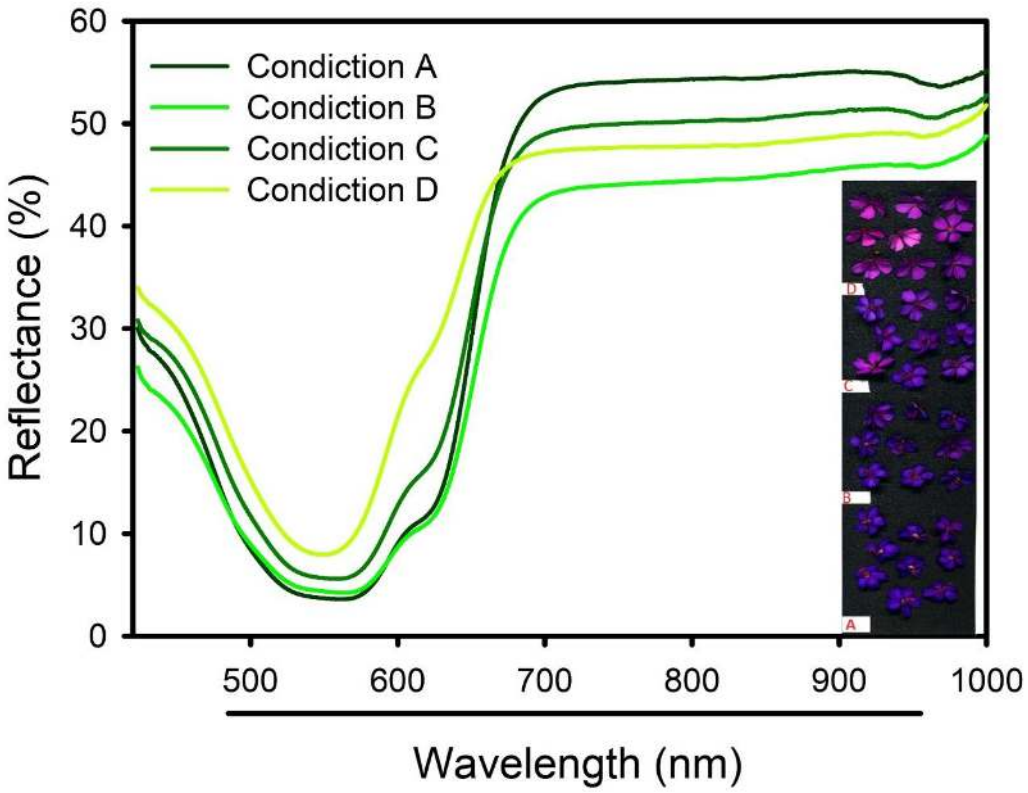

Figura 7. Mudança de intensidade na curva de reflectância UV em diferentes fases da flor *Pleroma granulosum.* A. Abertura da flor no primeiro dia. B. Abertura da flor no segundo dia. C. Abertura da flor no terceiro dia. D. Flor após as anteras caírem.

Intensidade de fluorescência das anteras por fotoperíodo

Nos primeiros dias de amostragem, as anteras apresentaram coloração muito acentuada, que decaiu abundantemente em 24h, tornando a intensidade praticamente nula ao longo do último dia de senescência (Figs. 8A, C). A variação na intensidade de fluorescência no decorrer dos dias ocorre pela degradação de compostos aromáticos e demais substâncias químicas presentes nesse órgão vegetal. Isso pode indicar a degradação da viabilidade do pólen, como observado em *Manihot esculenta* Crantz (VIEIRA et al., 2012), já que todas as anteras se encontravam "virgens", porque foram ensacadas e estavam isentas de coleta de pólen por polinização. Entretanto, estudos bioquímicos se fazem necessários para responder quais substâncias estão atuando no processo de senescência dos tecidos da antera e no grão de pólen.

Conclusões

Nesse estudo foi elucidado que, de fato, há variação de espectro ultravioleta e diminuição da fluorescência de compostos no decorrer da senescência das peças florais, quando comparadas ao primeiro e ao último dia da antese. Esse fenômeno foi causado, principalmente, pelo envelhecimento natural da flor, uma vez que foram privadas de polinização. O escurecimento das anteras é fonte de degradação química e foi descartada a possibilidade do mesmo ser promovido por queimadura solar, devido à não exposição das flores ensacadas à luz do sol durante os experimentos. A morfologia floral de *P. granulosum* é bastante interessante do ponto de vista da polinização, apresentando diversos fatores que indicam relação exclusiva planta-polinizador e coevolução das espécies ao longo dos anos.

Estudo futuros serão fundamentais para compreender se as variações de tonalidades são perceptíveis para os "olhos" das abelhas polinizadoras, se atuam como sinalização floral para os recursos mais abundantes e quais agentes químicos estão envolvidos na mudança de cor no espectro visível.

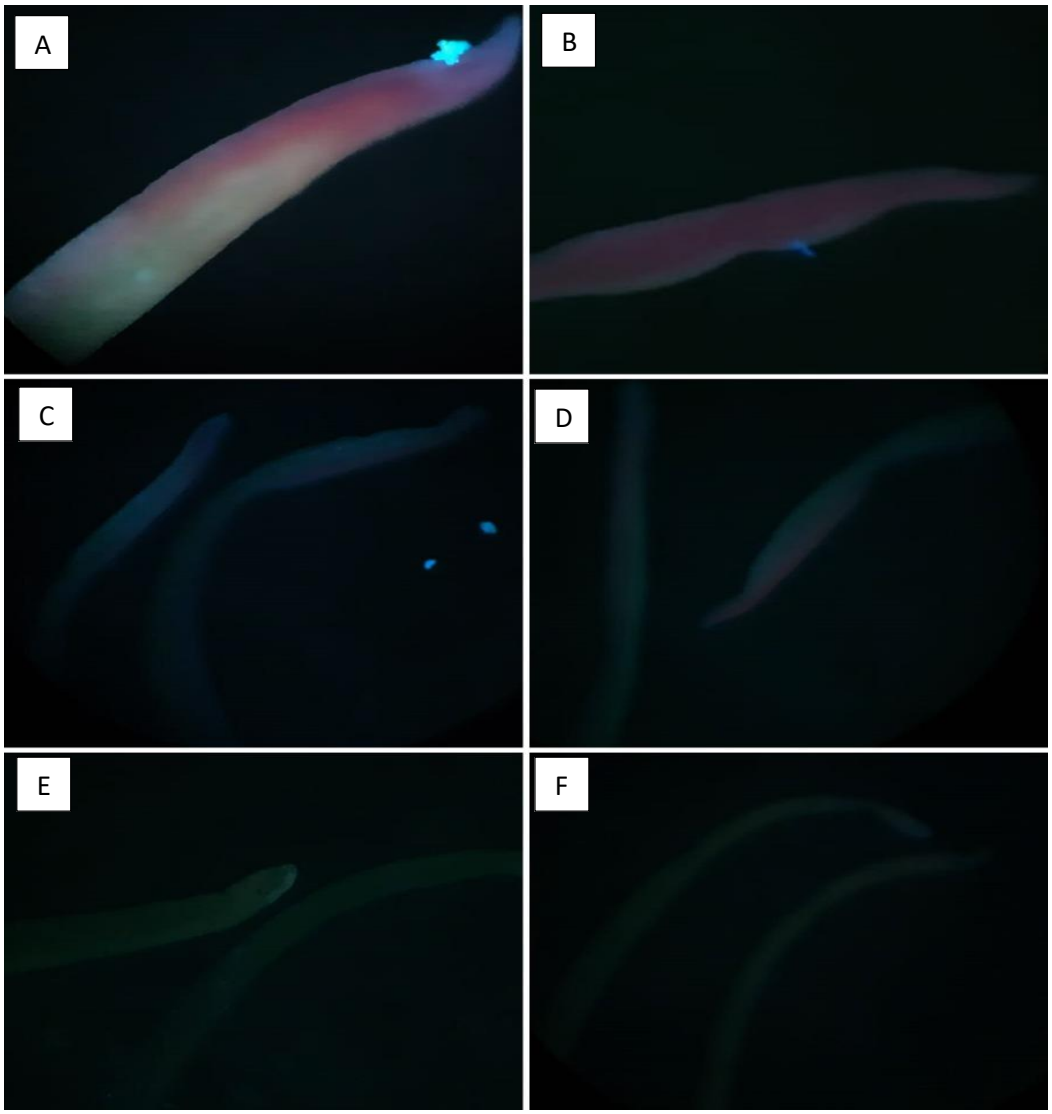

Figura 8. Mudança na Intensidade de fluorescência das anteras. A. 1°dia às 08h. B. 1°dia às 16h. C. 2°dia às 08h. D. 2°dia às 16h. E. 3°dia às 08h. F. 4°dia às 16h.

Agradecimentos

Agradecemos aos professores Hugo Cota-Sánchez, Luiz Antônio de Souza e Odair José Garcia de Almeida por toda orientação, aprendizado e dedicação ao longo do processo de desenvolvimento deste artigo. Agradecemos também ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada e à Universidade Estadual de Maringá por nos proporcionar tamanha experiência. Agradecemos também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por bolsa de mestrado a M.F.R.; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por bolsa de mestrado a V.R.A.

Referências

BARROS, Z.X.; TORNERO, M.T.; STIPP, N.A.F.; CARDOSO, L.G. & POLLO, R.A. Estudo da adequação do uso do solo, no município de Maringá - PR, utilizando-se de geoprocessamento. **Engenharia Agrícola**, v.24, n.2, p.436-444, 2004.

BRITO, V. L.; WEYNANS, K.; SAZIMA, M., & LUNAU, K. Trees as huge flowers and flowers as oversized floral guides: the role of floral color change and retention of old flowers in *Tibouchina pulchra*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p.362, 2015. Doi:10.3389/fpls.2015.00362

BUCHMANN, S.L. & HURLEY, J.P. A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. **Journal of Theoretical Biology**, v. 72, n. 4, p. 639-657, 1978.

CAMARGO, E.A. **O gênero *Leandra*, seções Carassanae, Niangae e Secundiflorae (Melastomataceae) no Paraná.** Dissertação de Mestrado em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 70p. 2008.

CASPER B.B, & PINE, L.A. Changes in corolla color and other floral characteristics in *Cryptantha humilis* (Boraginaceae): Cues to Discourage Pollinators? **Evolution,** v. 38, p.128, 1984.

CHITTKA, L. & RAINE, N.E. Recognition of flowers by pollinators. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 428-435, 2006.

COGNIAUX, C.A. Melastomaceae: Tibouchineae. **Flora Brasiliensis**, v. 14, n. 3, p. 205-484, 1885.

FARZARD, M.; GRIESBACH, R. & WEISS, M.R. Floral color change in *Viola cornuta* L. (Violaceae): A model system to study regulation of anthocyanin production. **Plant Science**, 2002.

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J.F.A. & SOUZA, M.L.D. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 145-161, 2012.

GORI, D.F. **Post-pollination phenomena and adaptative floral changes**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1983.

GUIMARÃES, P.J.F.; RANGA, N.T. & MARTINS, A.B. Morfologia dos tricomas em *Tibouchina* sect. *Pleroma* (D. Don) Cogn. (Melastomataceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 4, p. 0-0, 1999.

KÖPPEN, W. **Das geographisca System der Klimate**.Gebr, Borntraeger, 1-44, 1936.

LARSON B.M. & BARRETT S.C. The ecology of pollen limitation in buzz pollinated *Rhexia virginica* "Melastomataceae." **Journal of Ecology,** v. 87, p.371–381, 1999.

LEITE, F.B. **Função da heteranteria em duas espécies de *Tibouchina* (Melastomataceae): atração de abelhas e dinâmica de pólen**. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 58p. 2016.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v.1. 352p.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Curitiba: BADEP, 1968. 350 p.

MARTINS, A. B. et al. Melastomataceae. In: MARTINS, S.E.; WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J; GIULIETTI, A.M. & MELHEM, T.S. (Eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**.1ªed. São Paulo: Instituto de Botânica, v. 6, p. 1-167, 2009.

MELO, B.T. **Cor floral influência visitação de abelhas coletoras de óleo em *Byrsonima variabilis* A. Juss (Malpighiaceae)**. Dissertação de Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 33 p. 2017.

MICHELANGELLI, F.A.; GUIMARÃES, P.J.F.; PENNEYS, D.S.; ALMEDA, F. & KRIEBEL, R. Phylogenetic relationships and distribution of New World Melastomeae (Melastomataceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.171, p.38–60, 2013. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01295.x

MUXFELDT, H. **Apicultura para todos**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.

RODRÍGUEZ-GIRONÉS, M.A. & SANTAMARÍA, L. Why are so many bird flowers red? **PLOS Biology**, v. 2, n. 10, 2004. Doi: 10.1371/journal.pbio.0020350

ROMERO, R. **A família Melastomataceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil**. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 326p. 2000.

SOUZA, L.A. **Morfologia e anatomia vegetal (célula, tecidos, órgãos e plântula)**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2009.

VELOSO, H.P. & GÓES-FILHO, L. Fitogeografia brasileira - classificação fisionômico-ecológica da vegetação neotropical. **Boletim Técnico Projeto Radambrasil – Série Vegetação,** n.1, p. 1-80, 1982.

VIEIRA, L.J.; PASSOS, R.; OLIVIERA, T. D. S.; de SANTANA, J. R. F.; LEDO, C. D. S.; ALVES, A. & SOUZA, F. Avaliação da longevidade de grãos de pólen de de *Manihot esculenta* spp. *flabellifolia* por teste colorimétrico e fluorescência. In: Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE). In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. **Anais... Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos**, 2012.

WAINWRIGHT C.M. The floral biology and polination ecology of two desert lupines. **Bullettin of the Torrey Botanical Club,** n.105, p.24-38, 1978.

WEISS, M.R. Floral colour changes as cues for pollinators. **Nature,** n. 354, p. 227–229, 1991.

WURDACK, J. J. Melastomataceae of Santa Catarina**. Sellowia** v. 14, p.109- 217, 1962.