

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Tese de Doutorado

**Efeito do aquecimento atmosférico e elevação de CO₂ sobre
parâmetros genéticos e biológicos da espécie forrageira tropical
Stylosanthes capitata (Vogel).**

Discente: Priscila Marlys Sá Rivas.

Orientadora: Dra. Ana Lilia Alzate-Marin

Ingresso em: Março 2016

Versão Corrigida

Ribeirão Preto

2019

PRISCILA MARLYS SÁ RIVAS

**Efeito do aquecimento atmosférico e elevação de CO₂ sobre
parâmetros genéticos e biológicos da espécie forrageira tropical
Stylosanthes capitata (Vogel).**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética (Ciências Biológicas) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Dra. Ana Lilia Alzate-Marin

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

RIVAS, Priscila Marlys Sá

Efeito do aquecimento atmosférico e elevação de CO₂ sobre parâmetros genéticos e biológicos da espécie forrageira tropical *Stylosanthes capitata* (Vogel). Ribeirão Preto, 2019.

91 p.: IL.:30cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Dra. Ana Lilia Alzate-Marin.

1.Mudanças climáticas. 2. *Stylosanthes*. 3. Genética de populações vegetais, 4. Sistemas de cruzamento, 5. Diversidade genética, 6. Germinação

Nome: RIVAS, Priscila Marlys Sá

Título: Efeito do aquecimento atmosférico e elevação de CO₂ sobre parâmetros genéticos e biológicos da espécie forrageira tropical *Stylosanthes capitata* (Vogel).

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética, da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências, Área:
GENÉTICA.

Aprovado em: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____



Ao meu amado pai, José Manuel Rivas Mercury, que além de esteio pra mim, foi um grande professor e cientista. Sem sua ajuda e incentivo, eu não teria chegado aonde cheguei. Dedico essa tese a você (in memoriam).

Esta pesquisa foi financiada pelas seguintes agências de fomento: CNPq (140144/2016-1 e 150737/2014-9), FAPESP (15/23930-9 e 08/58075-8) e Projeto Temático FAPESP (2008/58075-8) coordenado pelo Prof. Carlos A. Martinez y Huaman da FFCLRP/USP.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador de todas as coisas, que me permitiu estar aqui, aprendendo tanto sobre mim mesma nesta imensa jornada da vida.

Agradeço ao Laboratório de Genética Vegetal e ao Campus da USP-Ribeirão Preto, ao Programa de Pós-Graduação em Genética, que me ampararam, sediaram os experimentos e permitiram a elaboração dos resultados desta pesquisa. Agradeço à FAPESP e CNPq, que cujo financiamento permitiu desenvolver esta pesquisa. Agradeço a minha bolsa de estudos, que me permitiu estudar, aprender e compartilhar os conhecimentos científicos, ao valorizar o estudante e o tempo dedicado a pesquisa. Agradeço a oportunidade de compartilhar os resultados do trabalho em eventos científicos e também desfrutar das trocas de saberes com outras pessoas, culturas e ambientes.

Ao meu pai José Rivas (in memoriam), grande cientista, homem guerreiro, que me deu a honra de me receber como filha. Que me ama com todas as suas forças, que me indicou o caminho da ciência como porta de crescimento intelectual, social e humano. Gratidão a esse homem, cuja vida escolheu como educador e que encontrou na academia a sua missão de vida, partilhando saberes para melhorar a vida de muitas pessoas através do conhecimento. Te amo muito, pai. Obrigada por ser esse exemplo de amor ao trabalho, ensinando sempre com tanta alegria e dedicação. Honro sua história de vida, honro ser sua filha e te agradeço por ser exatamente quem és. Pois, sou o que sou, porque você é o que é. A minha querida mãe, Raimunda Rivas, por sua doação incondicional a nossa família, cuidado sempre de nossa saúde e bem-estar, físico e emocional. Você é o nosso esteio. Mulher forte e determinada, que me inspira a cada momento com sua determinação. Muitas vezes abrindo mão de si mesma, para manter vivo o elo de nossa família. Obrigada Mãe, por ser quem você é. Por ter escolhido me ter como filha, nos criar e educar com tanto amor e carinho. Te amo, mamis. Gratidão por toda dedicação nos momentos difíceis e só você sabe o quanto demanda de você. Sou o que sou, porque você é o que é.

A minha querida orientadora, Dra. Ana Lilia Alzate-Marin, que como uma mãe me acolheu vinda “forasteira” de um outro programa de pós-graduação. Professora Ana, lhe agradeço de coração por toda paciência no meu processo do doutorado. De verdade, se não fosse você, eu não sei se estaria escrevendo essa tese hoje. Sua presença foi essencial para que eu fizesse as pazes com a academia. Com seu carinho, seus

conhecimentos e sua forma de ver a ciência e a educação me fizeram acreditar que é possível usar os conhecimentos aqui gerados, em prol da conservação da vida. Agradeço imensamente, toda dedicação, todo estímulo, toda partilha, pelas risadas, pelas arepas e pelas noites de alumbrado. Gratidão por absolutamente tudo! Por você ser quem você é, eu sou quem eu sou. Ao Prof. Dr. Carlos Martinez, por idealizar, encontrar os recursos e tornar viável o experimento Trop-T-FACE. Prof. Carlos, obrigada por todo seu esforço e dedicação pelo projeto, no ensino e na pesquisa. Desejo uma linda jornada de partilha dos conhecimentos aqui gerados, que continuem gerando e espalhando bons frutos.

Aos companheiros de Laboratório Carolina Costa e Fernando Bonifácio, que desde o início me receberam com carinho e alegria, que me ensinaram muito e me ajudaram durante todo o processo. Obrigada por tornar o dia a dia na faculdade mais humano e verdadeiro, obrigada pelas partilhas de vida e de aprendizados. A todas as queridas do Bloco B, que sempre tornaram o dia a dia alegre, com o seu sorriso, prosa e disposição em ajudar. Desejo tudo de melhor na vida todos de vocês!

Agradeço ao GelBot, equipamento lindo e delicado, (como um bebê) que trouxe tanta eficiência e agilidade nas análises. A espécie *Stylosanthes capitata*, que tanto me ensinou sobre resiliência, adaptação e potencial. Que me fez ver as similaridades entre os processos humanos e os processos no Reino Vegetal, cuja florzinha amarelinha doou seu néctar para minha consciência, me ajudando a me harmonizar com as escolhas que fiz e a resgatar minha força e resiliência.

Agradeço todos meus amigos e amigas dos mais diversos lugares e credos, a todos terapeutas e familiares (não escrever nomes, porque seriam muitos) que me estimularam, apoiaram e me auxiliaram a transformar os traumas em experiências de crescimento e evolução pessoal. Grata pela partilha, pela escuta ativa e pelo coração aberto em me acolher nos momentos de crise. Grata por terem composto a família Ribeirão Pretana, nos momentos em que a minha família de sangue não estava aqui.

Agradeço ao meu filho A-cor-dar, que propiciou a integração dos meus caminhos de pesquisadora, empreendedora e curandeira. Grata por ter me escolhido como mãe e por ter nascido durante o doutorado, com você, tudo ficou mais leve! Gratidão a Biologia, a Genética, à Mãe Terra e a todos os recursos vivos do Planeta. Pela conservação da vida é que a minha existência faz sentido e que a partilha dos conhecimentos aqui gerados, passa a ser verdadeira. Namastê!

*“Aprende, não para acumular
conhecimento como um tesouro pessoal,
mas para empregar o aprendido a serviço
do mundo”*

Rudolf Steiner

RESUMO

RIVAS, P.M.S. **Efeito do aquecimento atmosférico e elevação de CO₂ sobre parâmetros genéticos e biológicos da espécie forrageira tropical *Stylosanthes capitata* (Vogel).** 90p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Em cenários de mudanças climáticas, é crucial a estimativa de parâmetros genéticos de espécies de plantas economicamente importantes, com o objetivo de prever sua capacidade de resposta e adaptabilidade. Nesta pesquisa avaliou-se o efeito do aumento da temperatura (+2 °C) e da concentração atmosférica de CO₂ (600 ppm) sobre a produção de sementes, germinação, diversidade genética, diferenciação genética e taxas de cruzamento da espécie *Stylosanthes capitata*, uma leguminosa forrageira de importância econômica para agro-pecuária brasileira. Utilizou-se o sistema de simulação de mudanças climáticas Trop-T-FACE (*Temperature Free Air Controlled Enhancement and Free Air Carbon Dioxide Enrichment*) no campus da USP/RP, com 4 repetições cada. Após semeadura e crescimento inicial, as plantas foram submetidas a quatro tratamentos: [C] controle; [eCO₂] aumento da concentração de CO₂ atmosférico em 600 ppm; [eT] aumento da temperatura em 2°C e [eCO₂+eT] sua combinação. No final do ciclo de reprodução, dez plantas adultas (matrizes) de cada tratamento foram coletadas e as sementes retiradas de suas inflorescências. Avaliou-se a porcentagem de vagens vazias, porcentagem de sementes inviáveis, número de sementes produzidas por inflorescência, o peso de 100 sementes (mg), a germinabilidade (%) e o índice de velocidade de germinação (IVG). Para as análises genéticas, o DNA total foi extraído de amostras de tecido foliar (plantas matrizes) e de cotilédones frescos (progênies). Realizou-se a amplificação das famílias para 7 loci SSR polimórficos. A eletroforese e genotipagem foi realizada pelo sistema de eletroforese capilar GelBot. As análises foram realizadas nos softwares GenAlex, GenePop, GDA e MLTR. Diferenças entre tratamentos foram avaliadas pela ANOVA Fatorial 2x2 ($p < 0.05$). As sementes dos tratamentos eT e eCO₂+eT produziram um maior número de sementes por inflorescência ($p < 0,05$). Matrizes oriundas do tratamento eT apresentaram menor proporção de sementes inviáveis ($p < 0,05$). Germinabilidade e velocidade de germinação foram semelhantes em todos os tratamentos ($p > 0,05$). A maioria dos índices de diversidade genética e de fixação foram semelhantes entre gerações e tratamentos. Mas nas parcelas com aquecimento (eT) a heterozigiosidade esperada foi reduzida ($p < 0,05$), sugerindo um aumento nos homocigotos nessas populações. Os tratamentos em plantas parentais não influenciaram as taxas de cruzamento de focos múltiplos de *S. capitata* (C = 48,9%, eC = 54,4%, eT = 60,8%, eCO₂ + eT = 47,1%, $p > 0,05$), mostrando resiliência em seu sistema de cruzamento misto em as condições experimentais estudadas. O comportamento do polinizador, o número de flores por planta que promove a autogamia, bem como a possível degeneração dos grãos de pólen nos tratamentos de aquecimento, podem contribuir para os resultados observados. Esta pesquisa apresenta resultados inovadores úteis para orientar estratégias de preservação e melhoramento de germoplasma de *S. capitata* frente ao cenário iminente de mudanças climáticas.

Palavras chave: Mudanças climáticas, *Stylosanthes*, genética de populações vegetais, sistemas de cruzamento, diversidade genética, germinação.

ABSTRACT

RIVAS, P.M.S. RIVAS, P.M.S. **Effect of atmospheric warming and CO₂ increase on genetic and biological parameters of tropical forage species *Stylosanthes capitata* (Vogel). 90p.** PhD Thesis - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

In climate change scenarios is crucial the estimation of genetic parameters of economically important plant species aiming to predict their responsiveness and adaptability. This research evaluated the effects of temperature increase (+2 ° C) and atmospheric CO₂ concentration (600 ppm) on seed production, germination, genetic diversity, genetic differentiation and crossing rates of *Stylosanthes capitata*, a legume forage plant with economic importance for Brazilian agriculture. Trop-T-FACE (*Temperature Free Air Controlled Enhancement and Free Air Carbon Dioxide Enrichment*) climate change simulation system was used at the USP / RP campus, with 4 repetitions each. After sowing and initial growth, the plants were submitted to four treatments: [C] control; [eCO₂] increase of atmospheric CO₂ concentration to 600 ppm; [eT] temperature rise by 2 ° C and [eCO₂ + eT] their combination. At the end of the breeding cycle, a total of ten adult plants (matrices) from each treatment (n=40) were collected and the seeds removed from their inflorescences. The percentage of empty pods, percentage of unfeasible seeds, number of seeds produced by inflorescence, weight of 100 seeds (mg), germinability (%) and germination speed index (IVG) were evaluated. For family's amplification, 16 progenies from each matrix plant were germinated *in vitro* (n=640). Total DNA was extracted from samples of leaf tissue (parent plants) and fresh cotyledons (progenies). Families were amplified to 7 polymorphic SSR loci. Electrophoresis and genotyping was performed by the GelBot capillary electrophoresis system. The analyzes were performed using GenAlex, GenePop, GDA and MLTR software. Differences between treatments were evaluated by 2x2 factorial ANOVA ($p < 0,05$). Seeds of eT and eCO₂ + eT treatments produced a higher number of seeds by inflorescence ($p < 0,05$). Matrices from the eT treatment presented lower proportion of unviable seeds ($p < 0,05$). Germinability and germination velocity were similar in all treatments ($p > 0,05$). Most genetic diversity and fixation indices were similar across generations and treatments. But in the warmed plots (eT) the expected heterozygosity was reduced ($p < 0,05$), suggesting an increase in homozygotes in these populations. Treatments on parental plants did not influence the multiple focus crossing rates of *S. capitata* (C = 48,9%, eC = 54,4%, eT = 60,8%, eCO₂ + eT = 47.1%, $p > 0,05$), showing resilience in its mixed crossing system under the studied experimental conditions. Pollinator behavior, the number of flowers per plant that promotes autogamy, as well as the possible degeneration of pollen grains in heating treatments, may contribute to the observed results. This research presents innovative results useful to guide strategies of preservation and improvement of *S. capitata* germplasm against the imminent scenario of climate change.

Keywords: Climate changes, *Stylosanthes*, plant population genetics, breeding systems, genetic diversity, germination.

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
1.1 A problemática das mudanças climáticas	17
1.2 Efeito das mudanças climáticas na biologia vegetal.....	20
1.3 O gênero <i>Stylosanthes</i> e a espécie <i>Stylosanthes capitata</i>	23
1.4 Importância ecológica e econômica de <i>Stylosanthes capitata</i>	28
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES.....	32
2.1 O Problema	32
2.2 Justificativa	32
2.3 Perguntas.....	34
2.4 Hipóteses.....	35
3. OBJETIVOS	36
4. METODOLOGIA.....	37
4.1 Área de estudo e localização do campo experimental	37
4.2 Descrição do sistema Trop-T-FACE (<i>Temperature free air controlled enhancement and Free-air carbon dioxide enrichment</i>)	37
4.3 Coleta das plantas matrizes.....	40
4.4 Análises de sementes	41
4.5 Análises de diversidade genética e taxas de cruzamento.....	43
4.6 Análises estatísticas	46
5. RESULTADOS	49
5.1 Efeito do aquecimento, da elevação de CO ₂ e da sua interação na produção, coloração e germinação de sementes da espécie <i>S. capitata</i>	49
5.2 Efeito do aquecimento, da elevação de CO ₂ e da sua interação nos parâmetros de diversidade genética, endogamia e diferenciação genética em indivíduos da espécie <i>S. capitata</i>	57
5.3 Efeito do aquecimento e da elevação de CO ₂ e da sua interação nas taxas de cruzamento de famílias da espécie <i>S. capitata</i>	61
6. DISCUSSÃO	66
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS: Resultados	88
ANEXOS: Artigos	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Média da temperatura terrestre e oceânica registrada em Setembro de 2019. Retirado de: NOAA. (Imagem retirada de: <https://www.ncdc.noaa.gov/temp-and-precip/global-maps/>) 18
- Figura 2.** Distribuição Natural de *S. capitata*, evidenciando a ocorrência natural da espécie nas Regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e no Nordeste da Venezuela (Imagem retirada de Costa e Schultze-Kraft, 1990). 24
- Figura 3.** Detalhes das estruturas foliares elípticas e trifolioladas (A) e das brácteas que compõem a estrutura das inflorescências (B) de *Stylosanthes capitata*. Adaptado de Silva Medeiros et al., (2014) com a inclusão de fotos autorais. (Fotos autorais realizadas em campo Experimental, USP-RP). 25
- Figura 4.** Detalhes das estruturas morfológicas das flores, frutos e sementes da espécie *Stylosanthes capitata* Vogel. A) Flor papilionácea, com corola amarela, guias de néctar e estrutura da quilha. Em destaque as estruturas reprodutivas, estames dimorfos e gineceu. B) Vagens bi-lobuladas com eixo rudimentar piloso C) Aspecto da semente madura de *S. capitata*. (Fotos autorais do Laboratório de Genética Vegetal adaptadas com figuras de Medeiros et al., 2014 e Pereira-Noronha, 1982). 26
- Figura 5.** Flores de *Stylosanthes capitata* e em destaque, a flor sendo visitada pela abelha *Paratrigona lineata* em campo experimental. (Fotos autorais realizadas por Maluf, em campo Experimental, USP-RP). 27
- Figura 6.** Pastagem em consórcio do cultivar Estilosantes Campo Grande e *Brachiaria decubens*. A) *Stylosanthes capitata*, B) *Stylosanthes macrocephala* (Imagem retirada de Machado et al., 2010). 30
- Figura 7.** A) Esquema Experimental do Sistema Trop-T-FACE implantado na Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto pelo Projeto Temático FAPESP 2008/58075-8. B) Detalhe das parcelas experimentais cultivadas com *Stylosanthes capitata* e dos aparelhos utilizados para o aquecimento. 38
- Figura 8.** Médias seguidas do erro padrão das temperaturas do dossel nos tratamentos Controle (C), elevado CO₂ (eC), elevada temperatura (eT) e a combinação eC+eT durante o período experimental de 24/04/2015 a 10/06/2015 (Imagem gerada pelo Software Excel). 39
- Figura 9.** Variação da umidade do solo nos tratamentos Controle (C), elevado CO₂ (eC), elevada temperatura (eT) e a combinação eC+eT durante o período experimental de 24/04/2015 a 10/06/2015 (Imagem gerada pelo Software Excel). 40
- Figura 10.** A) Aspecto da planta matriz em campo. B) Aspecto de uma planta madura, no momento de sua coleta em campo. C) Aspecto visual das inflorescências maduras. D) Vagens extraídas das inflorescências maduras (aumento 4x). E) Semente retirada da vagem após leve escarificação de seu tegumento (aumento 4x). (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2015, 2016). 41
- Figura 11.** A) Experimento de germinação in vitro da mistura de sementes de *S. capitata* de plantas matrizes de cada uma das 16 parcelas. B) Detalhe das plântulas em processo de germinação em placa de Petri. C) Semente de *S. capitata* no início da germinação. (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2015, 2016). 42
- Figura 12.** Morfologia das plântulas desenvolvidas após germinação in vitro. A) Plântulas com maior vigor. B) Plântulas normais de tamanho médio. C) Plântulas anormais (tamanho pequeno,

cor amarelada, caulículo retorcido) (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2016).	43
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% do DNA genômico extraído de amostras de plântulas obtidas após germinação das sementes. (Foto: Laboratório Genética Vegetal – USP/RP, 2016).	44
Figura 14. Gel de poliacrilamida 8% não desnaturante, mostrando os produtos de amplificação do DNA de 5 indivíduos da espécie <i>Stylosanthes capitata</i> com 2 marcadores escolhidos para estudos de diversidade genética e taxas de cruzamento.	45
Figura 15. Picos de amplificação e imagem representativa dos géis dos produtos de PCR com os marcadores A2A (Pico de 237pb ~ 240pb) e E4 (Pico de 300pb) após eletroforese capilar no sistema GelBot. Marcadores de tamanho molecular de 20pb e 1000pb. Amostras da matriz de <i>S. capitata</i> em vermelho e de suas progênes em azul (Imagens geradas pelo Software GelBot). ..	46
Figura 16. Diferentes tonalidades do tegumento das sementes de <i>Stylosanthes capitata</i> utilizadas para classificação da coloração (Aumento de 4x). (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2016).	51
Figura 17. Porcentagem de sementes em cada classe de coloração do tegumento, em cada um dos tratamentos. As colunas representam o valor percentual médio e as barras verticais mostram o erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos após teste ANOVA-Fatorial. Legenda - P: Preta, MR: Marrom Rajada, ML: Marrom Lisa, BR: Bege Rajada, BL: Bege Lisa, V: Verde. (Imagem gerada pelo software GraphPad Prism v7.0).	52
Figura 18. Aspecto das sementes dos diferentes tratamentos 24 horas após o início do experimento de germinação. (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2016).	54
Figura 19. Aspecto das plântulas dos diferentes tratamentos 168 horas (7 dias) após o início do experimento de germinação. Acima: Placas de Petri contendo plântulas germinadas. Abaixo: sementes que não germinaram (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2016).	55
Figura 20. Distribuição da característica qualidade das plântulas germinadas nos diferentes tratamentos. Colunas brancas GN: Germinação normal, colunas cinza-claro GA: Germinação anormal e colunas cinza escuro NG: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($*p < 0.05$) entre os tratamentos após teste ANOVA-Fatorial. Sementes não germinadas (Imagem: GraphPadPrism 7).	57
Figura 21. Parâmetros de diversidade genética nos diferentes grupos experimentais. A) Número de alelos, B) Número de alelos efetivo, C) Heterozigosidade observada, D) Heterozigosidade esperada nos diferentes grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($*p < 0.05$) entre os tratamentos após teste ANOVA-Fatorial. (Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism v.8.0).	59
Figura 22. Médias e erro padrão do índice fixação de progênes dos diferentes grupos experimentais. (Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism v.8.0).	60
Figura 23. Dados de média e erro padrão em gráfico de barras, por tratamento. A) Taxa de cruzamento multiloco, B) Taxa de cruzamento uniloco, C) Taxa de cruzamento entre parentes, D) Correlação de autofecundação (Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism v.8.0).	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sete loci microssatélite utilizados na amplificação das famílias de *S. capitata*, desenvolvidos por Santos et al. (2011)..... 45
- Tabela 2.** Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros porcentagem de vagens vazias e de sementes mortas nos diferentes tratamentos. Valores expressos em média, seguidos de erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem de variação. 49
- Tabela 3.** Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros número de sementes por inflorescência e peso de cem sementes (mg) nos diferentes tratamentos. Valores expressos em média, seguidos de erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem de variação..... 50
- Tabela 4.** Número absoluto de sementes de *Stylosanthes capitata* por classe de coloração do tegumento nos diferentes tratamentos. Legenda - P: Preta, MR: Marrom Rajada, ML: Marrom Lisa, BR: Bege Rajada, BL: Bege Lisa, V: Verde. 52
- Tabela 5.** Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros germinabilidade (%) e índice de velocidade de germinação médio (IVG) de sementes da espécie *S. capitata* dos diferentes grupos experimentais. Média seguida de erro padrão (entre parênteses). 53
- Tabela 6.** Índice de velocidade de germinação médio (IVG) e germinabilidade (%) de sementes da espécie *S. capitata* nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média, seguidos de erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem de variação. 56
- Tabela 7.** Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros de diversidade genética analisados na população de progênies dos diferentes tratamentos. Médias seguidas do erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem de variação..... 58
- Tabela 8.** Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros de diversidade genética analisados na população de matrizes dos diferentes tratamentos. Médias seguidas do erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem de variação.**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 9.** Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para o índice de fixação na população de progênies. Médias seguidas do erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem de variação. 60
- Tabela 10.** Matriz de divergência genética. Análise da estatística F_{ST} (Nei, 1973) entre populações de matrizes e progênies de *S. capitata* dos diferentes tratamentos (abaixo da diagonal). Legenda: *** $p < 0.001$ após Teste Exato de Fisher..... 61
- Tabela 11.** Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros de taxas de cruzamento analisados nos diferentes tratamentos. F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem média de variação. 62
- Tabela 12.** Demais parâmetros de sistema de cruzamento de progênies de *S. capitata*, separados pela medida de cada uma das quatro repetições. Médias seguidas do erro padrão. 64
- Tabela 13.** Estimativa de parâmetros de taxas de cruzamento de *S. capitata* avaliadas nas progênies dos diferentes tratamentos. Erro padrão da média entre parênteses, obtido após 1000 reamostragens bootstraps pelo programa MLTR. 65

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 A problemática das mudanças climáticas

O sistema climático global é uma rede complexa e dinâmica, cuja homeostase foi responsável pela evolução das espécies que povoaram a terra (Marengo e Souza Jr, 2018). A influência humana, na história evolutiva da Terra, por milênios não afetou a dinâmica natural do sistema climático global. Registros retirados de núcleos de gelo da estação de Vostok (Antártica) evidenciam que a concentração atmosférica de CO₂ nos últimos 420.000 anos esteve dentro de uma faixa operacional normal (de 180 a 280 partes por milhão por volume) variando ciclicamente ao longo das eras glaciais (Steffen et al., 2006).

Entretanto, em finais do século XIX, quando teve início a revolução industrial - fruto do desenvolvimento social, econômico e tecnológico da humanidade - a atmosfera terrestre passou a se modificar com magnitude tão grande quanto a variação total observada nas eras glaciais anteriores (Steffen et al., 2006). Os últimos 50 anos foram os de maior transformação da relação humana com a natureza desde o início da história da humanidade. A nova concentração de CO₂ atmosférica parece ter sido atingida a uma taxa de 10 a 100 vezes mais rápido do que em qualquer outro momento dos 420.000 anos anteriores do planeta e estão, portanto, muito fora do que ocorreria de forma natural no Sistema Terrestre (Falkowski et al., 2000).

A enorme quantidade de carbono estocada em florestas e na forma de combustíveis fósseis passou a ser utilizada para obtenção de energia, resultando em uma emissão desenfreada e crescente de CO₂ e gases como metano, ozônio e óxido nitroso (gases de efeito estufa) para a atmosfera, atingindo seus níveis mais altos nos últimos 400 milênios (Crutzen, 2016). Moléculas destes gases absorvem a radiação infravermelha emitida pela superfície terrestre, impedindo a dissipação do calor da Terra para o espaço, comprometendo assim a manutenção do equilíbrio energético do planeta (Maslin, 2008). Desta forma, o excesso de calor não dissipado resulta no aquecimento da temperatura média na superfície terrestre. Estima-se que até 2050, a temperatura média global deve aumentar de 1,3 a 2°C (IPCC, 2013), porém o aquecimento da superfície terrestre deverá ser superior a esta média, dependendo dos cenários de emissões antrópicas dos gases de efeito estufa (GEE) (IPCC, 2013; IPCC 2014).

Segundo o Painel Intergovernamental das Mudanças Climáticas (2014), a temperatura média da terra deve aumentar de 1,3 a 1,8°C até 2050. As estimativas para o CO₂ atmosférico apontam que concentração deste gás estará acima de 600 ppm para o ano de 2050, podendo ultrapassar os 800 ppm e chegar a 1000 ppm até o final deste século (Long et al., 2004; IPCC, 2013; IPCC, 2014).

Novos recordes de temperatura global são registrados há quatro anos consecutivos (de 2015 a 2018) pela Administração Nacional Oceânica e Atmosférica da NASA (Figura 1) (NOAA, 2016). Eventos como secas, alagamentos, ondas de calor, desertificação, queimadas, alterações pluviométricas e furacões têm se tornado mais frequentes em várias regiões do globo (Wu et al., 2011; Diffenbaugh et al., 2011).

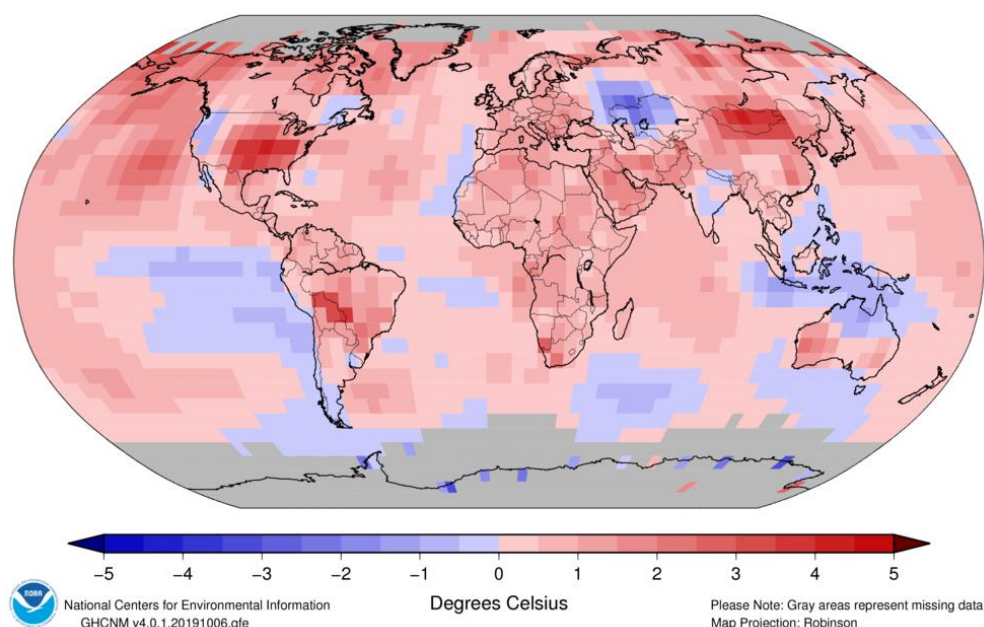


Figura 1. Média da temperatura terrestre e oceânica registrada em Setembro de 2019. Retirado de: NOAA. (Imagem retirada de: <https://www.ncdc.noaa.gov/temp-and-precip/global-maps/>)

O aumento na probabilidade de ocorrência de eventos climáticos extremos sem precedentes, em diversos pontos do planeta, pode causar danos inestimáveis à diversidade e riqueza de espécies, de ecossistemas, assim como do capital humano econômico e social (Beniston e Stephenson, 2004; Erfranian et al., 2017). O iminente cenário das mudanças climáticas é uma das maiores preocupações da comunidade científica na atualidade. Mas a urgência e universalidade do tema, que envolve também consequências sociais, políticas e econômicas a níveis globais, vem desencadeando

interesse e participação de ativistas da nova geração, na intenção de promover medidas e alternativas sustentáveis para o futuro do planeta (O'Brien et al., 2018).

Outra problemática que circunda o cenário das mudanças climáticas é o da segurança alimentar (Godfray e Garnett, 2014). Segundo previsões do painel Internacional de Mudanças Climáticas, o continente sul-americano sofrerá mudanças nos padrões de temperatura e de pluviosidade, que afetará principalmente a indústria agro-pecuária (IPCC, 2003; Barros e Albernaz, 2014). Estima-se uma redução significativa na produtividade agrícola nas regiões tropicais, principalmente devido ao aumento da temperatura induzido pelo desmatamento, associado a declínio na precipitação média ou na frequência das chuvas (Adams et al., 1998; Marengo et al., 2009; Lawrence e Vandecar, 2015). Durante os últimos três séculos, a população humana aumentou para mais de 6 bilhões e espera-se que chegue a 10 bilhões no fim deste século (Crutzen, 2016). O aumento da população global e em um iminente cenário de mudanças climáticas reflete um risco potencial de redução na disponibilidade de alimentos em certas áreas do globo a nível global, principalmente nos países exportadores de commodities (Wheeler e Von Braun, 2013).

As leguminosas constituem o segundo maior grupo vegetal de importância agrícola, levando em conta a área colhida e produção total mundial, perdendo somente para os cereais (Gepts et al., 2005). Várias espécies da família das leguminosas foram as primeiras a serem domesticadas visando sua utilização na alimentação humana devido ao grande interesse em consumir suas vagens e frutos, tais como feijão, ervilha, grão-de-bico, soja, amendoim, entre outras. (Molares e Radio, 2012). Segundo projeções, o Brasil poderá experimentar perda substancial no rendimento de plantações de trigo e soja sofrerão redução de 15-50% e 6-61%, respectivamente, dependendo do cenário e do tipo de estresse experienciado pelas plantações (Siqueira et al., 1994; Marengo et al., 2009). Por isso, é fundamental investimentos em pesquisas e ações que promovam o entendimento, criação e manutenção de sistemas mais resilientes às mudanças climáticas, pois cabe a própria humanidade superar os desafios causados por escolhas insustentáveis, revertendo os quadros e caminhando rumo a um futuro que preze pela preservação do sistema global de apoio à vida terrestre (Wheeler e Von Braun, 2013).

1.2 Efeito das mudanças climáticas na biologia vegetal

Plantas de metabolismo C3 (como as leguminosas tropicais) demonstraram uma melhor capacidade de reagir e aclimatar-se ao aumento de temperatura previsto, resultando em maiores taxas de fotossíntese, o que resultaria em um aumento no rendimento das culturas nas regiões tropicais, dependendo do (Martinez et al., 2015; Way e Yamori, 2014).

Sabe-se que a temperatura é o fator abiótico que determina transições importantes em dois principais estágios do ciclo de vida das plantas: na reprodução e na germinação (Huang et al., 2017). Nos últimos anos, diversos estudos vêm comprovando o efeito do aquecimento na fenologia das espécies vegetais, apontando para uma antecipação do florescimento (Rosenzweig et al., 2008; Fitter e Fitter, 2002), aumento na abundância e distribuição de flores (Schauber et al., 2002, Hegland et al., 2009), redução no volume de néctar produzido (Jakobsen e Kristjánsson, 1994; Takkis et al., 2005) e a alterações no tempo e intensidade da floração, variando conforme o tipo de espécie (Petanidou e Smets, 1996; Saavedra et al., 2003). De forma geral, o aumento do esforço reprodutivo induzido pela temperatura, resulta no aumento da abundância de flores e nas taxas de visitação, como consequência, alteram também o comportamento e composição da comunidade de polinizadores, resultando, muitas vezes em maiores taxas de cruzamento e produção de sementes (Hegland et al., 2009). Elevadas temperaturas também induzem alterações no hábito de vida, na atividade de forrageamento, tamanho do corpo, maturidade, tempo de vida de polinizadores (Bosch et al., 2000; Radmacher e Strohm, 2011), assim como na sua distribuição espacial (Giannini et al., 2017) e limitação gênica entre diferentes paisagens (Jaffé et al., 2019).

Por outro lado, os efeitos fisiológicos da elevação de CO₂ na fisiologia vegetal são bem estudados e bem estabelecidos na literatura. De forma geral, o incremento de CO₂ aumenta a fixação de Carbono em plantas de metabolismo C3, resultando em um aumento da aquisição de carbono fotossintético (Bishop et al., 2014), que por consequência aumenta a produção de açúcares, estimulando o crescimento e rendimento das plantas (Martinez et al., 2015). Como consequência destas alterações primárias, parâmetros morfológicos (como área foliar, peso de sementes) e fenológicos (como tempo de florescimento) podem ser modificados com o incremento de CO₂ (Springer e Ward, 2007). As respostas ao incremento de CO₂ e de temperatura demonstram ser muito peculiares, pois cada espécie reage de uma forma muito específica aos diferentes

tipos de estresse aplicados e estudados (Jablonksi et al., 2002; Springer e Ward, 2007). Por exemplo, o incremento de CO₂ acelerou o tempo de florescimento em arroz (Seneweera et al., 1994) mais o retardou em sorgo (Ellis et al., 1995), enquanto que em *Avena sativa* (aveia) não se observou nenhuma mudança significativa neste parâmetro (Sæbø e Mortensen, 1996).

Desta forma, fica evidente que, os impactos fisiológicos e fenológicos das mudanças climáticas podem resultar ou não em consequências negativas diretas para as populações de plantas com flores (Hatfield e Pruger, 2015). Mas com certeza, afetarão um processo minuciosamente selecionado pela evolução: a especificidade da interação planta-polinizador. Desencontros temporais (fenológicos) e espaciais (distribucionais) podem alterar a disponibilidade e a eficiência destes parceiros mutualistas. Dependendo das mudanças fenológicas, de 17 a 50% dos polinizadores podem sofrer perturbações/quebras/rompimentos no suprimento de alimento devido a “desencontros” temporais/espaciais com as espécies vegetais, resultando em mudanças nos padrões de reprodução, a diversidade e conseqüentemente, no potencial evolutivo da população (Hegland et al., 2009).

Junto a maior possibilidade de desencontros entre flores-polinizadores, adiciona-se o declínio já observado nas populações de insetos polinizadores, relatado a nível global (Pereira et al., 2010; Potts et al., 2010; Giannini et al., 2012; Saraiva et al., 2012; Kennedy et al., 2013; De Palma et al., 2016; Wein et al., 2017), um cenário ainda mais preocupante, pois mais de 80% das angiospermas dependem dos animais para a polinização (Ollerton et al., 2011; Hallman et al., 2017) e a redução dos serviços ecossistêmicos realizados por estes animais acarretará graves implicações para a sobrevivência das populações vegetais e produtividade de cultivos.

Por isso, uma grande complexidade nos sistemas de cruzamento vegetais foi selecionada evolutivamente, uma vez que os fatores externos ambientais a que são expostas não são controláveis (Holsinger, 1996). O sistema de reprodução de uma espécie vegetal determina como a informação genética se organiza ao longo das gerações (espacial e temporalmente) (Alfenas, 2006). A recombinação dos genes entre os indivíduos da população parental passará a compor o mosaico genético da descendência, determinando o potencial adaptativo e evolutivo daquela população (Wright, 1921). Existe imensa diversidade nos sistemas reprodutivos das espécies vegetais. A reprodução pode ser assexuada (apomixia e estaquia), sexuada (alogamia,

autogamia) ou mista. A principal vantagem da reprodução sexuada é que, durante a meiose para formação dos gametas, ocorre a recombinação gênica, um processo extremamente importante para a variabilidade genética da prole, uma vez que possibilita a ocorrência de novas combinações gênicas, gerando novos genótipos (Silverton e Charlesworth, 2001).

Espécies de sistema de cruzamento misto apresentam diferentes graus de autofecundação ou fecundação cruzada, o que lhes confere um alto grau de adaptabilidade às circunstâncias e eventos ambientais, pois podem usar mais de uma estratégia reprodutiva para assegurar a sobrevivência da descendência (Goodwillie et al., 2005). Muitas espécies possuem mecanismos evolutivos que evitam a autopolinização, tais como: auto-incompatibilidade, a heterostilia ou heteromorfismo floral (diferenças espaciais e temporais na abertura e morfologia das mesmas) (Nazareno e Reis, 2012). Também existe a possibilidade de que a variação ocorra independente de biologia floral, mas sim, de acordo com a disponibilidade e o comportamento dos polinizadores, favorecendo a autopolinização ou a polinização cruzada em cada contexto específico (Holsinger, 1991; Goodwillie et al., 2005).

Em uma população estável, cada adulto deve ser substituído por no mínimo outro adulto. A estratégia das plantas para esta sucessão é produzir um grande número de descendentes para assegurar que parte deles atinja a maturidade (Fenner et al., 2005). As sementes desempenham um papel crítico na ecologia e na dinâmica das populações vegetais, dada sua importância para a distribuição espacial da espécie, para o estabelecimento de novos habitats, para a determinação da diversidade genética da comunidade e persistência da população mesmo em condições abióticas temporariamente desfavoráveis (Fenner et al., 2005, Huang et al., 2016).

O ambiente ao que a planta-mãe foi submetida durante o estágio de desenvolvimento ontogenético das sementes é capaz de afetar não somente a composição bioquímica da semente (como o conteúdo de amido, de nitrogênio, de proteínas e hormônios) (Fenner, 1991; Galloway, 2001; Donohue, 2009; Liu et al., 2011), mas também a germinação (Mousseau e Fox, 1998) (Donohue et al., 2010; Marty e Bassirrad, 2014). Dentre o ciclo de vida das plantas, a germinação das sementes constitui um dos processos mais críticos e pode ser definida como o crescimento inicial do embrião após um período de dormência, onde o seu metabolismo encontrava-se inativo (Ferreira e Borghetti, 2004). De acordo a revisão de Hampton e colaboradores

(2013) há um consenso da literatura sobre a redução na germinação de sementes induzida pelo aumento da temperatura. Já, o incremento de CO₂ parece estimular a massa de sementes, principalmente em leguminosas (C3), sem necessariamente alterar o conteúdo de nitrogênio da semente (Hirosaka et al, 2010; Hampton et al., 2013). Este efeito é resultado da degeneração de estruturas intra e extracelulares como, por exemplo, alterações na membrana celular, redução na atividade enzimática, disfunções mitocondriais (Hampton et al., 2013).

1.3 O gênero *Stylosanthes* e a espécie *Stylosanthes capitata*

O gênero *Stylosanthes* é um importante gênero de leguminosas forrageiras nas Américas, principalmente das regiões tropical e subtropical. O gênero foi inicialmente descrito por Swartz em 1788, com as espécies (*S. hamata* (L.) Taubert e *S. viscosa* Sw), que haviam sido previamente descritas por Linnaeus em 1753, antes mesmo que o gênero fosse nomeado. A primeira revisão crítica do gênero foi feita por Vogel quase um século depois, em 1838 (Mannetje, 1984).

O gênero *Stylosanthes* engloba 48 espécies, das quais quase 40 são endêmicas do continente Americano (Williams et al., 1984; Lewis et al., 2005; Costa, 2006). Acredita-se que o centro de origem deste gênero seja na América Central e do Sul (Stace e Edye, 1984). As espécies de *Stylosanthes* apresentam distribuição natural em regiões temperadas, tropicais e subtropicais das Américas (Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e México), também no Sudeste Asiático (Norte da Austrália, Tailândia e Índia) e zona tropical Africana (Stace e Edye, 1984; Williams et al., 1984; Costa e Schultze-Kraft, 1993). Devido a sua importância econômica para produção animal, por volta dos anos 60-70 o germoplasma de espécies deste gênero foi coletado e armazenado em bancos de germoplasma na Austrália e nas Américas (Coradin e Schultze-Kraft, 1990; Edye e Mass, 1997).

De 25 a 30 espécies deste gênero ocorrem no Brasil, que é considerado um dos principais centros de origem de *Stylosanthes*, graças ao alto endemismo e elevada diversidade de espécies, que ocorrem em quase todas as regiões do país (Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste) (Brandão e Costa, 1979; Lewis et al., 2005; Costa e Valls, 2013; Santos-Garcia et al., 2011). Dez espécies do gênero *Stylosanthes* são consideradas de importância econômica, destacando-se a *Stylosanthes capitata* Vogel, nosso objeto de estudo (Calles e Schultze-Kraft, 2016). *Stylosanthes capitata* é uma

espécie nativa brasileira, mas não endêmica do Brasil, sendo encontrada também na Venezuela (Figura 2, Costa e Schultze-Kraft, 1990). No Brasil, já foram descritas ocorrências desta espécie em quase todas as regiões: Centro-Oeste (MT, GO, DF, MS), Norte (RR, PA), Nordeste (MA, PI, CE, RN, PB, PE, BA, SE) e Sudeste (MG, SP) (Costa, 2006; Fortuna-Perez et al., 2011; Silva Medeiros et al., 2014).

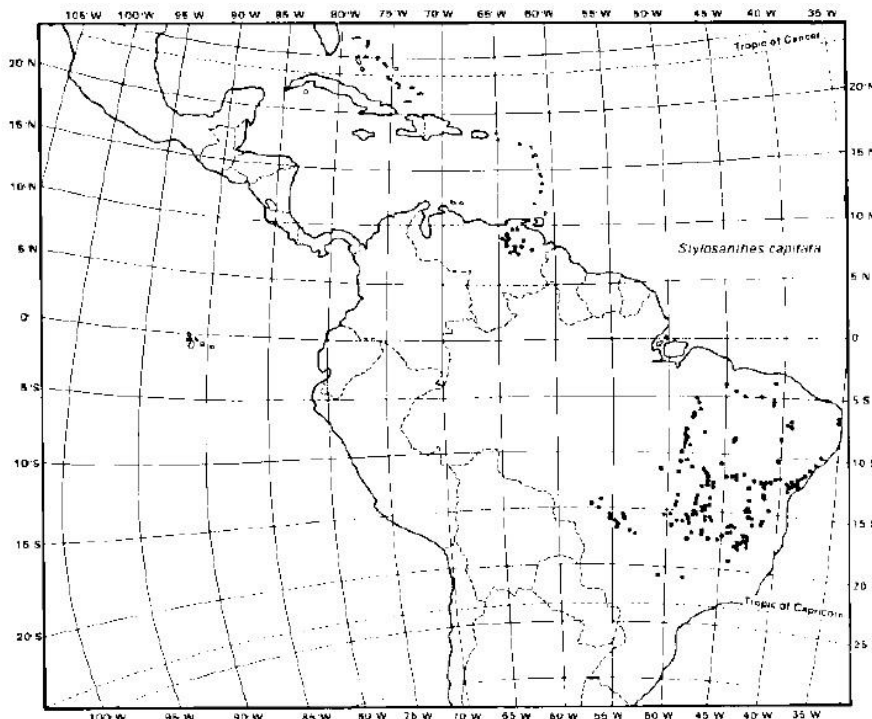


Figura 2. Distribuição Natural de *S. capitata*, evidenciando a ocorrência natural da espécie nas Regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e no Nordeste da Venezuela (Imagem retirada de Costa e Schultze-Kraft, 1990).

S. capitata apresenta ocorrência natural em condições semi-áridas, secas (em áreas que passam por cerca de cinco meses de seca) e com menor frequência em regiões tropicais úmidas (Costa e Schultze-Kraft, 1990). Adapta-se bem a solos areno-argilosos, argilosos ou argilo-pedregosos, com pH variando de 4,0 a 6,0 (solos ácidos) (Costa e Schultze-Kraft, 1990; Costa et al., 2008; Fortuna-Perez et al., 2011; Costa e Valls, 2013).

Morfologicamente, *S. capitata* é uma planta subarborescente, perene, com caule cilíndrico difuso e piloso. As folhas são compostas por três folíolos elíptico-ovados, de coloração verde escuro, com filotaxia alternada e pilosidade em ambas as faces (adaxial e abaxial) (Figura 3A, Costa et al., 2008; Fortuna-Perez, 2011). Os ramos maduros apresentam inflorescências formadas por brácteas modificadas em espigas terminais (Figura 3B). As flores são pequenas (1 cm), pediceladas, com cor amarela

(que varia de 8,5 a 14,5 mm de extensão) formadas por 5 pétalas, das quais 2 formam a estrutura da quilha falcada, que abriga em se interior as anteras e estilete (Figura 4A), hemafroditas, com dez estames dimorfos (cinco maiores e cinco menores) e um estilete filiforme, de ovário bi-ovulado (Costa, 2006, Tozzi, 2016).

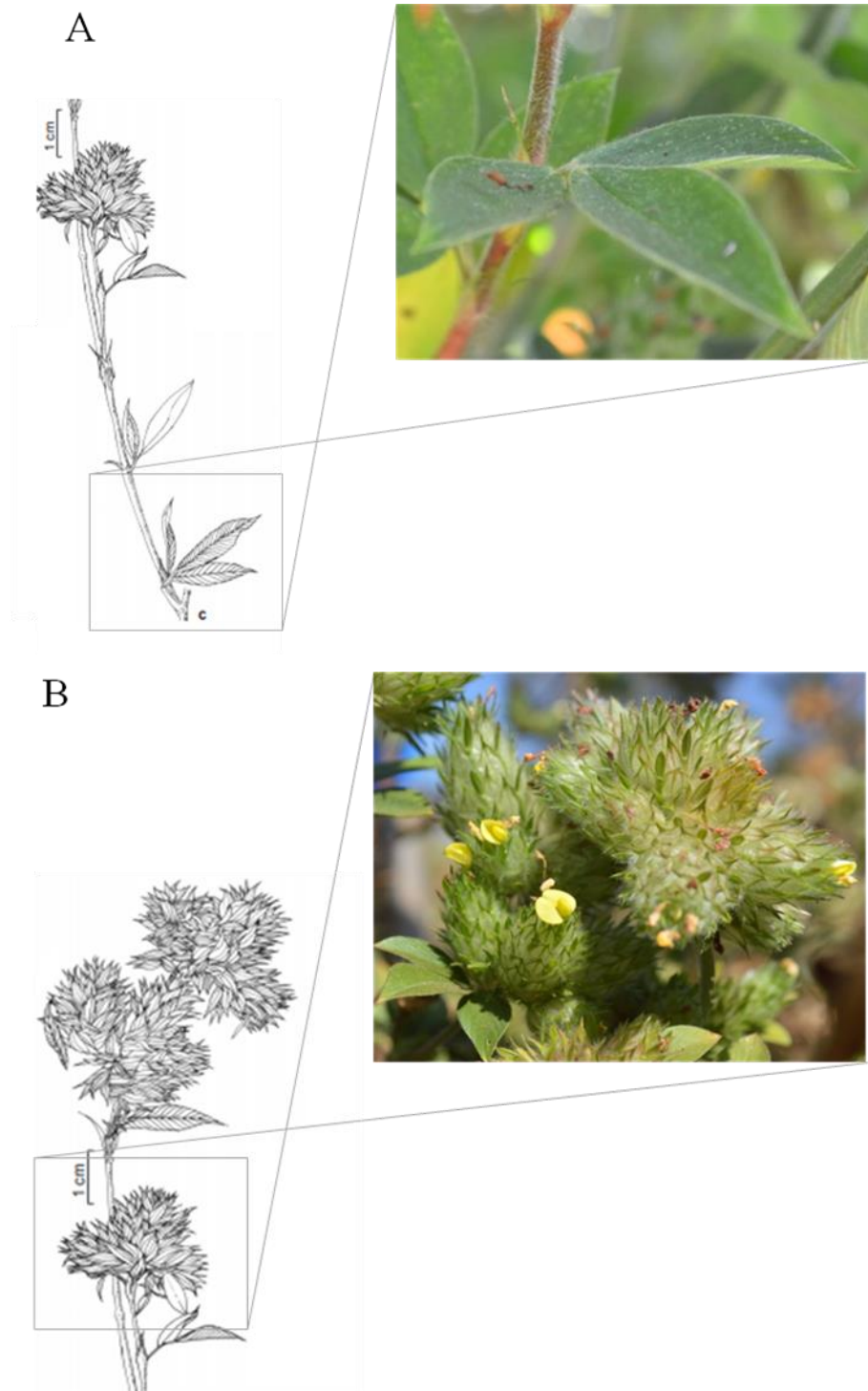


Figura 3. Detalhes das estruturas foliares elípticas e trifolioladas (A) e das brácteas que compõem a estrutura das inflorescências (B) de *Stylosanthes capitata*. Adaptado de Silva Medeiros et al., (2014) com a inclusão de fotos autorais. (Fotos autorais realizadas em campo Experimental, USP-RP).

Os frutos são do tipo lomento, com 1 ou 2 artículos (Figura 4B). As sementes (de 1-2 mm) são largo-oblongas elípticas ou ovóides, com coloração variada: desde preta, marrom lisa a bege pintalgada (Figura 4C) (Costa, 2006; Tozzi, 2016).

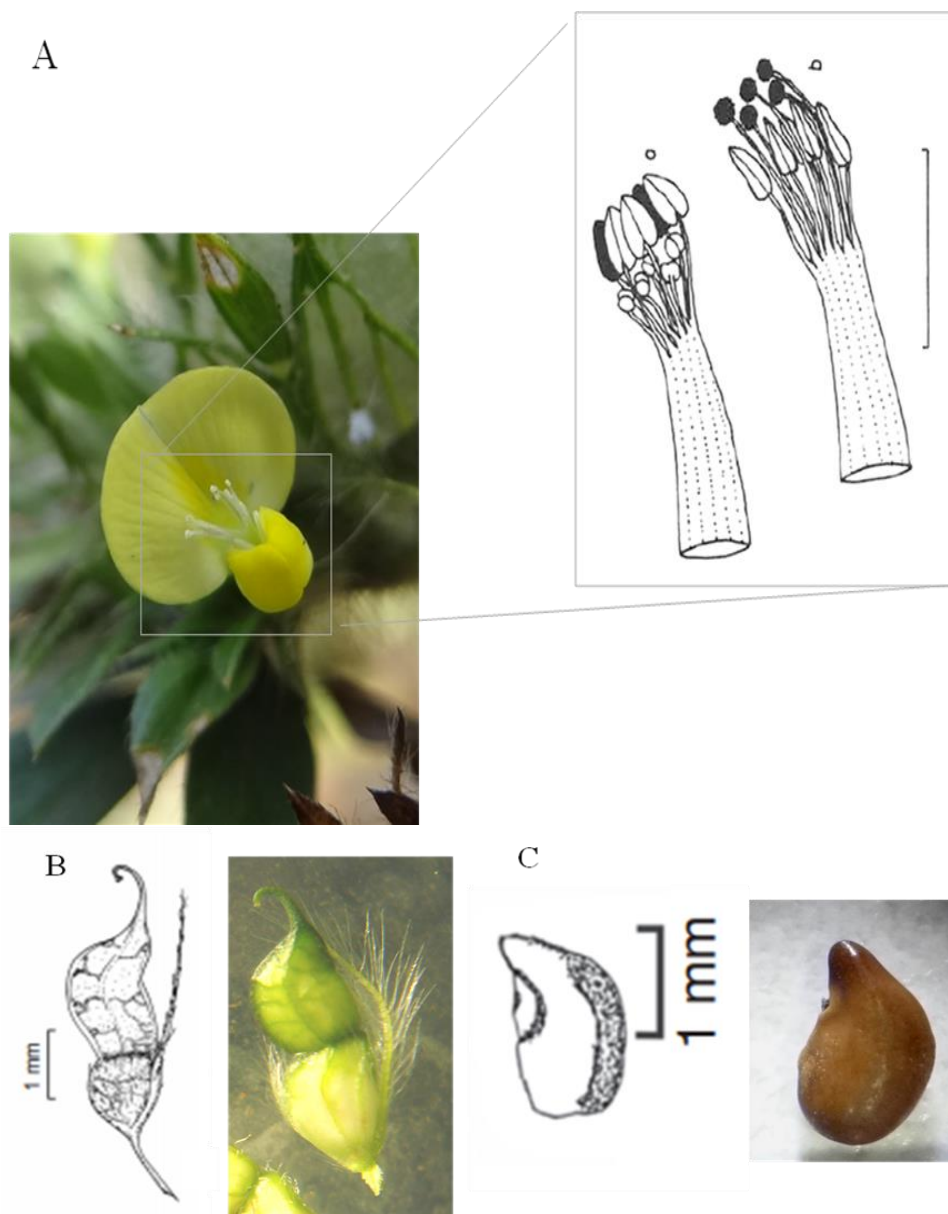


Figura 4. Detalhes das estruturas morfológicas das flores, frutos e sementes da espécie *Stylosanthes capitata* Vogel. A) Flor papilionácea, com corola amarela, guias de néctar e estrutura da quilha. Em destaque as estruturas reprodutivas, estames dimorfos e gineceu. B) Vagens bi-lobuladas com eixo rudimentar piloso C) Aspecto da semente madura de *S. capitata*. (Fotos autorais do Laboratório de Genética Vegetal adaptadas com figuras de Medeiros et al., 2014 e Pereira-Noronha, 1982).

Como típicas flores de papilionáceas, as flores de *Stylosanthes* apresentam a estrutura da quilha, duas pétalas formam uma espécie de plataforma que permite o pouso das abelhas, mas também favorece o depósito de pólen no corpo dos

polinizadores (Ramalho e Rosa, 2010). Flores de quilha da família Fabaceae são classicamente conhecidas por serem polinizadas por abelhas grandes (Frankie et al., 1983). Em regiões costeiras do Brasil é frequente a visitação de flores de *Stylosanthes* por abelhas do gênero *Xylocopa* e também de *Psaenythia* (Silberbauer-Gottsberger e Gottsberger, 1988; Viana et al., 2002).

Abelhas do gênero *Exomalopsis* e *Megachile* também são apontadas como potenciais polinizadoras do gênero *Stylosanthes* (Ramalho e Rosa, 2010). Entretanto, dados prévios de nosso grupo de pesquisa evidenciaram que em campo experimental houve uma elevada taxa de visitação de *S. capitata* por *Apis mellifera* e *Paratrigona lineata* (Figura 5), que se destacaram por serem polizadoras efetivas, dada a presença de grãos de pólen na região de sua corbícula e na área torácica (Teixeira et al., 2015; Maluf et al., 2018). Outras possíveis polinizadoras de *S. capitata* seriam espécies de Augochlorini, *Exomalopsis* e Megachilidae.



Figura 5. Flores de *Stylosanthes capitata* e em destaque, a flor sendo visitada pela abelha *Paratrigona lineata* em campo experimental. (Fotos autorais realizadas por Maluf, em campo Experimental, USP-RP).

Em *Stylosanthes*, o florescimento é considerado longo, ocorrendo de novembro a junho, mas caracterizado por um breve período de abertura floral diário, que para a espécie *S. capitata* é de aproximadamente 4h por dia (Costa et al., 2008; Maluf et al., 2018). Ramalho e Rosa (2010) observaram que, para a espécie *S. viscosa* o dimorfismo das anteras era essencial para o mecanismo de exposição do pólen e é comum para outras espécies do gênero *Stylosanthes*.

Antes de a flor abrir, os estames maiores (do verticilo externo, com anteras elípticas) estão posicionados acima dos estames menores (do verticilo interno, com

anteras arredondadas). Com abertura da flor e acionamento da quilha, os estames menores acabam atuando como um êmbolo, para que o pólen saia das anteras elípticas (destaque da Figura 4A). Este processo pode favorecer tanto a polinização cruzada, como a autopolinização, já que a auto-polinização pode ser facilitada pelo comportamento de forrageamento das abelhas, que visitam várias flores de uma mesma planta. Assim, a maior parte das espécies do gênero *Stylosanthes sp.* apresentam um sistema de cruzamento misto (Stace, 1982). Miles (1983) relata as espécies *Augochlora sp.*, *Exomalopsis penelope* e *Trigona sp.*, como seus polinizadores mais frequentes.

Nas inflorescências de *Stylosanthes sp.* existem flores e frutos em diferentes estágios de desenvolvimento, de forma que o amadurecimento das sementes muitas vezes ocorre paralelamente ao processo de florescimento (Ramalho e Rosa, 2010). O florescimento costuma iniciar em maio e a frutificação a partir de junho, cerca de 9 a 12 semanas após a antese da primeira flor (De Castro et al., 1994; Machado et al., 2010).

As sementes do gênero *Stylosanthes* são recalcitrantes, com tegumento rígido e duro, mas com elevada resistência à desidratação (Américo et al., 2015). Para a quebra da dormência das sementes em condições naturais, é necessário passar pelo trato gastrointestinal dos animais (Alencar et al., 2009; Deminicis et al., 2006; Brasil, 2009). Após quebra da dormência do tegumento, as sementes se estabelecem e com o período de chuva nos estágios iniciais de desenvolvimento, associado a uma redução no pastoreio na área já garantem o estabelecimento das novas plântulas no pasto (Andrade et al., 2010).

1.4 Importância ecológica e econômica de *Stylosanthes capitata*

No Brasil ocorrem cerca de 220 gêneros e 2.822 espécies de leguminosas, em quase todos os seus biomas (amazônico, mata atlântica, cerrado, pantanal e pampas) (Lima et al., 2013). A importância das leguminosas nos biomas brasileiros, deve-se ao seu papel essencial no equilíbrio destes ecossistemas (Dutra et al., 2014). A associação de suas raízes com bactérias *Rhizobium spp.* lhes confere a capacidade de fixar nitrogênio, processo que consiste na transformação do nitrogênio (N₂) atmosférico em amônia (NH₄-), na presença do complexo enzimático nitrogenase. A simbiose planta-bactéria confere vantagem para ambas as espécies e é uma importante fonte de nitrogênio biológico para os solos, sejam de ecossistemas naturais e ou de sistemas

agrícolas, por isso, são capazes de colonizar solos marginalizados, pobres em nutrientes (Thomas, 1995; Jarvis, 2000; Alves et al., 2006; Spehar e Trecenti, 2011).

Práticas agrícolas sustentáveis sugerem a rotatividade de leguminosas nos cultivos visando à fertilização natural dos solos, aumentando os teores de nitrogênio (adubação verde), sendo indicada para cobertura de solos de áreas previamente degradadas. Estas práticas são altamente benéficas para a qualidade e produtividade do solo e vêm sendo largamente utilizadas em sistemas agro-ecológicos (Peoples et al, 2009). Este tipo de adubação natural é ainda mais vantajosa em um cenário de aquecimento global, onde a utilização de adubos nitrogenados contribui para o aumento de gases de efeito estufa, devido a emissão de óxido nitroso (Hungria et al, 2006; Rodrigues et al, 2017).

Espécies leguminosas nativas são apontadas como favoritas para utilização em pastagens tropicais em consórcio com gramíneas, pois além de fornecerem elevado conteúdo protéico aos animais, incrementam a fertilidade do solo, mantendo a produtividade dos pastos (Rodrigues et al, 2017). A degradação de pastagens é caracterizada pela redução no vigor, na produtividade, qualidade e na capacidade natural de recuperação do pasto e ocorre em cerca de 20% das pastagens a nível mundial, principalmente por práticas de manejo inadequadas, como superlotação do pasto ou insuficiente tempo de recuperação após pisoteio pelo rebanho (FAO, 2009; Dias-Filho, 2014).

O Brasil é um dos principais produtores e exportadores de carne bovina, correspondendo a mais de 15% da produção mundial (FAO, 2015; Silva et al., 2018). Aproximadamente 90% da carne animal brasileira é produzida em sistema de pastoreio extensivo (Oliveira-Silva et al., 2017). Este sistema é o mais utilizado, dada a redução no índice de doenças dos animais e seu baixo custo, pois a oferta de pastagem minimiza o custo fixo da ração animal e não depende das oscilações do mercado de grãos e cereais (Ferraz e Felício, 2010; Jank et al., 2014; Dias-Filho, 2014). Nos últimos anos, observa-se uma redução gradual na utilização de espécies nativas nas pastagens brasileiras, destacando-se gramíneas forrageiras originárias da África tropical e subtropical (IBGE, 2007; Dias-Filho, 2014; Pedreira et al., 2015).

A espécie leguminosa nativa *S. capitata*, se destaca, pela boa adaptação a solos ácidos com baixos níveis de fósforo, por resistir à dessecação e à antracnose, o que garante uma forragem de alta qualidade mesmo em condições de estresses abióticos

(Grof et al., 1979; Schultze-Kraft e Keller-Greins, 1994). *S. capitata* é utilizada junto a espécie *S. macrocephala* no cultivar “Estilosantes Campo Grande” da Embrapa Gado de Corte, desenvolvido em 1990 através de práticas de melhoramento na Fazenda Maracujá em Campo Grande (MS) (Embrapa, 2007). O cultivar é composto por 20% de sementes de *S. macrocephala* e 80% por sementes de *S. capitata* (Andrade et al., 2010).

As vantagens das sementes deste cultivar incluem a alta resistência à antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e a solos que naturalmente apresentam baixa fertilidade (Embrapa, 2007). No ano 2004, após quatro anos do lançamento comercial do cultivar Campo grande, mais de 150 mil hectares do território brasileiro já havia sido plantado com a mistura de espécies de *Stylosanthes*, principalmente na região do Cerrado (Fernandes et al., 2005). Anualmente são produzidos de 8 a 14 toneladas de forragem por hectare, com boa taxa de produção de sementes (de 200 a 400 kg por hectare), além do alto valor nutritivo encontrado nas folhas e na planta inteira, garantindo elevado conteúdo proteico para alimentação animal (Verzignassi e Fernandes, 2002; Embrapa, 2007). Estudos *in vitro* evidenciam uma digestibilidade entre 550 e 700 g/kg de matéria seca de *Stylosanthes spp.*, sendo as folhas a parte mais digerível pelos ruminantes (EMBRAPA, 2007; Silva et al., 2013). A Figura 6 apresenta o cultivar estilosantes campo grande (*S. capitata* e *S. macrocephala*) cultivado em consórcio com *Brachiaria decubens*.



Figura 6. Pastagem em consórcio do cultivar Estilosantes Campo Grande e *Brachiaria decubens*. A) *Stylosanthes capitata*, B) *Stylosanthes macrocephala* (Imagem retirada de Machado et al., 2010).

O consórcio entre gramíneas e leguminosas vem sendo bastante utilizado e aceito nos sistemas agropecuários, pois garante a disponibilidade de alimento do rebanho no período de seca e melhora significativamente a qualidade do solo (Barcellos et al., 2008). Andrade e colaboradores (2003) evidenciaram que a combinação da leguminosa *Stylosanthes guianensis* com o capim *Panicum maximum* (Capim Mombaça) apresentou uma boa produtividade. Maiores teores de proteína na dieta animal foram obtidos com duas espécies de *Brachiaria* utilizadas em consórcio com o cultivar Estilosantes Campo Grande (Fernandes et al., 2005). Pinheiro e colaboradores (2014), utilizando o cultivar Estilosantes Campo Grande, verificaram que a inclusão de leguminosas junto a gramíneas reduz o uso de fertilizantes nitrogenados e também contribui para melhor desempenho animal.

Entretanto, pesquisas recentes apontam que o uso da leguminosa acima de 40% no consorcio com gramíneas pode causar dano ao trato gastro-intestinal dos animais, comprometendo não só a digestão, mas também a saúde e qualidade do rebanho (Andrade et al., 2010; Ubiali et al., 2013; Da Silva-Matos et al., 2013). Dados do Censo Agropecuário (2017) evidenciam que quase 50% dos 150 milhões de hectares do território brasileiro utilizado em pastagens são áreas de desmatamento (Oliveira et al., 2004). A intensificação do desmatamento (principalmente nas regiões de fronteira do Cerrado e da Amazônia) contribui para um grande desequilíbrio energético e climático do planeta (Martinelli e Filoso, 2008, Nepstad et al., 2009, Martha et al., 2012). Além de que, a substituição de áreas nativas por áreas de pastoreio extensivo é um dos principais fatores que contribui para a infertilidade do solo, para a contaminação das águas dos lençóis freáticos, além de ser a principal fonte da emissão de gases do efeito estufa, principalmente o metano (Gouvello et al., 2011, Godfray et al., 2018). O aumento de áreas e da produtividade dos sistemas agro-pecuários, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, está intimamente ligado ao crescimento exponencial das populações humanas e do mercado que consome carne animal (FAO, 2009).

Em conjunto, os fatores supracitados (que constituem o atual modelo de produção de carne animal em nosso país) revelam um cenário preocupante e delicado, que necessita intervenções sustentáveis e coerentes, para adoção de estratégias que viabilizem novos modelos de cultivo de pastagem, que melhorem a produtividade e reduzam o avanço do desmatamento de áreas de florestas nativas.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

2.1 O Problema

As mudanças climáticas são um dos maiores fatores de perturbação antrópica impostos aos ecossistemas da atualidade (Walther et al., 2002; Hegland et al., 2009). Alterações nas concentrações atmosféricas de CO₂, metano, ozônio e óxido nitroso (gases do efeito estufa) contribuem para o aumento da temperatura média do planeta, uma vez que moléculas destes gases absorvem a radiação infravermelha emitida pela superfície terrestre, impedindo a dissipação do calor da Terra para o espaço (Maslin, 2008). A potencialização do efeito estufa desestabiliza o equilíbrio energético do planeta e resulta em alterações sem precedentes no sistema climático global (IPCC, 2014).

O aumento da temperatura na superfície do planeta não é mais uma projeção futurista, se não uma realidade. No ano de 2018, a temperatura média da superfície do planeta foi pelo quarto ano consecutivo, um novo recorde global, de acordo com análises independentes da Administração Nacional Oceânica e Atmosférica da NASA (NOAA, 2018). O Painel Intergovernamental das Mudanças Climáticas estimou que a temperatura média da terra deve aumentar de 1,3 a 1,8°C até 2050. (IPCC, 2014). A literatura já relata risco iminente de perda de diversidade e riqueza de espécies, mesmo no cenário mais otimista de emissões de GEE (caso a temperatura média do planeta aumente só em 1,5°C). Assim, todos os organismos estarão sujeitos aos mais diversos tipos de estresses ambientais: como secas, ondas de calor, queimadas, enchentes, dentre outros (Maslin, 2008).

Segundo previsões do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas, o continente sul-americano (em especial) sofrerá grandes impactos no setor agro-pecuário dado os possíveis efeitos das alterações climáticas globais sobre a produção de grãos, pastagens e cultivos (IPCC, 2013;). Como muitas pastagens brasileiras são cultivadas em consórcio com espécies leguminosas forrageiras nativas, que constituem uma ótima fonte de nutrientes para o gado com baixo custo para os produtores.

2.2 Justificativa

As grandes oscilações climáticas que ocorrem desde as últimas décadas já vêm causando mudanças na distribuição e abundância de muitas espécies (Hegland et al., 2009). Bens e serviços básicos fornecidos pelo sistema de suporte à vida planetária

(suficiência e a qualidade dos alimentos, os recursos hídricos, a qualidade do ar e um ambiente propício à saúde humana) estão sendo afetados e colocados em risco pelo atual cenário climático global.

Mesmo frente a todo esse cenário, ainda são poucos os estudos que buscam entender as respostas dessas alterações no comportamento reprodutivo de espécies vegetais tropicais de importância econômica (Ollerton et al., 2011; Hallman et al., 2017; Scaven e Rafferty, 2013). Para a maioria das espécies tropicais, inclusive as de maior potencial econômico (como é o caso de *S. capitata*) não existem dados científicos referentes à previsão de respostas biológicas e genéticas em cenários futuros de aumento de temperatura e emissão de gases de efeito estufa. Desta forma, este trabalho é pioneiro no país na tentativa de preencher esta lacuna e, assim, fornecer informações necessárias para subsidiar práticas de manejo de *S. capitata* em tais cenários.

Como líder do mercado mundial de carne, o Brasil necessita de estudos que compreendam o comportamento futuro de espécies importantes para a indústria agropecuária. A espécie leguminosa nativa *Stylosanthes capitata* Vogel é amplamente utilizada em sistemas de pastoreio extensivo e se destaca pela alta qualidade proteica da sua forragem e por se desenvolver bem em solos pobres (Santos et al., 2009; Santos-Garcia et al., 2011). Por isso é fundamental o estudo do comportamento reprodutivo e fisiológico destas espécies para entendimento de mecanismos adaptativos ou para criação de estratégias de melhoramento, a fim de minimizar as perdas de diversidade, resultantes de possíveis eventos climáticos extremos.

Neste cenário de incertezas e riscos eminentes de extremos climáticos, espécies de sistema de cruzamento misto apresentam uma vantagem evolutiva devido a capacidade de adaptar-se conforme a presença ou ausência de polinizadores para sua reprodução. Populações com essa característica podem variar desde altos níveis de cruzamento a altos níveis de auto-fecundação (Brown, 1990). Entretanto, todas as mudanças no padrão de reprodução das espécies vegetais terão certamente grandes impactos ecológicos, econômicos e sociais, principalmente as espécies utilizadas em cultivos e pastagens (Boote et al., 2005).

Os primeiros estudos dos sistemas de cruzamento em espécies vegetais baseavam-se na observação de marcadores morfológicos, assim como do comportamento de seus polinizadores através de experimentos controlados de

polinização (Faleiro, 2007). Somente no fim da década de 80, que os marcadores de isoenzimas foram desenvolvidos e as análises passaram a usar marcadores genéticos, de maior acurácia e confiabilidade e cujo padrão de herança é fácil de rastrear na prole (Silverton e Charlesworth, 2001).

Dentre os marcadores moleculares, os marcadores do tipo microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) constituem um dos mais utilizados. Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) são repetições em *tandem* de pequenas sequências de nucleotídeos (de 1 a 6 pares de base), distribuídos aleatoriamente no genoma da maioria dos organismos eucariotos (Tautz e Renz, 1984; Kalia et al., 2011; Gao et al, 2013). São facilmente amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR) e vêm sendo amplamente utilizados na genotipagem de plantas nas últimas décadas (Saiki et al, 1988; O'Hanlon et al, 2000). Os marcadores microssatélite são úteis estimar diversidade genética, o fluxo de genes, as taxas de cruzamento e o grau de parentesco entre os genótipos, para construção de mapas de ligação e mapeamento de locus (Takesaki et al., 1996; Guidugli et al., 2012; Feres et al., 2012; Vieira et al, 2016). Sistemas automatizados de genotipagem de locos microssatélites, recentemente desenvolvidos, permitem amplificar e detectar múltiplos fragmentos, oferecem maior acurácia, menor custo, menor tempo de análise e menor probabilidade de erros oriundos da análise manual e visual (Ziegle et al., 1992; Rangel et al., 2005).

2.3 Perguntas

Os experimentos realizados neste trabalho visaram responder as seguintes questões, relacionadas aos efeitos das mudanças climáticas sobre a espécie *S. capitata*:

1) Os tratamentos com elevação da temperatura (+2°C), elevação de CO₂ (600 ppm) e de ambos exercerão efeito significativo sobre os parâmetros biológicos (como proporção de abortos, de sementes inviáveis, número de sementes produzidas por inflorescência, peso das sementes e coloração do tegumento das sementes) das sementes de *S. capitata* produzidas sob estes estresses no ambiente parental?

2) Os tratamentos com elevação da temperatura (+2°C), da elevação de CO₂ e suas interações afetarão as taxas de germinação e a qualidade das plântulas germinadas de *S. capitata*?

3) O aumento da temperatura do ar atmosférico (+ 2 °C), das concentrações de CO₂ (600 ppm) e suas interações terão efeito sobre os níveis de diversidade genética e endogamia em indivíduos da espécie *S. capitata* crescidos nestas condições ambientais?

4) O aumento da temperatura do ar atmosférico (+ 2 °C), das concentrações de CO₂ (600 ppm) e suas interações terão efeito sobre as taxas de cruzamento das progênes da espécie *S. capitata* geradas nestas condições ambientais?

2.4 Hipóteses

1) A exposição das plantas de *S. capitata* aos tratamentos de elevada temperatura, elevado CO₂ e suas interações afetará positivamente a biomassa das sementes e o número de sementes por inflorescência, devido ao efeito destes tratamentos na capacidade fotossintética da planta, e conseqüentemente, na realocação de recursos para as sementes. Entretanto, estes tratamentos também elevarão as proporções de abortos e de sementes inviáveis, como resultado do aumento do esforço reprodutivo.

2) Os tratamentos com elevação da temperatura (+2°C) ou com elevação de CO₂ não afetarão significativamente as taxas de germinação e a qualidade das plântulas germinadas, uma vez que a espécie estudada é nativa da flora Brasileira e ocorre em regiões biogeográficas tropicais, possivelmente bem adaptada a temperaturas elevadas.

3) Como resultado do aumento das taxas de cruzamento nas parcelas com aquecimento, se observará uma maior diversidade genética nestas parcelas, assim como uma conseqüentemente redução na endogamia com possível diferenciação genética entre as subpopulações dos tratamentos aquecidos (eT, eC+eT) e os demais tratamentos (Controle, eC).

4) O investimento reprodutivo induzido (como aumento no número de flores e antecipação da abertura floral) e na visitação de polinizadores na elevação da temperatura (Teixeira et al., 2015; Alzate-Marin et al., 2017) resultará num aumento nas taxas de polinização cruzada e das progênes oriundas dos tratamentos eT e eCO₂+eT, quando comparadas ao tratamento Controle (C). Já nas parcelas com incremento de CO₂ a hipótese é de que as taxas de cruzamento não sejam afetadas, uma vez que não induziu alterações na abundância e na fenologia das flores, como já relatado por (Alzate-Marin et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos das mudanças climáticas em simulações futuras (aumento da temperatura em + 2 °C, das concentrações de CO₂ em 600ppm e das suas interações), em condições de campo, utilizando o sistema Trop-T-FACE sobre a biologia de sementes, sobre a diversidade genética e taxas de cruzamento da espécie *Stylosanthes capitata* Vogel, uma leguminosa forrageira de importância econômica.

3.2 Específicos

- Avaliar os efeitos do aumento da temperatura em + 2 °C, das concentrações de CO₂ em 600ppm e das suas interações sobre parâmetros biológicos (proporção de abortos, de sementes inviáveis, número de sementes produzidas por inflorescência, peso das sementes e coloração do tegumento das sementes) de sementes da espécie *S. capitata* crescidas no sistema Trop-T-FACE;
- Avaliar os efeitos do aumento da temperatura do ar atmosférico (+ 2°C) sobre germinação e qualidade das plântulas germinadas a partir de sementes da espécie *S. capitata* crescidas no sistema Trop-T-FACE;
- Analisar os efeitos do aumento da temperatura do ar atmosférico (+ 2°C) sobre os níveis de diversidade genética e endogamia de adultos e progênies da espécie *S. capitata*.
- Analisar os efeitos do aumento da temperatura do ar atmosférico (+2°C) sobre as taxas de cruzamento de uma população de plantas da espécie *S. capitata* em famílias crescidas no sistema Trop-T-FACE;

4. METODOLOGIA

4.1 Área de estudo e localização do campo experimental

O material vegetal utilizado neste estudo foi obtido do plantio de sementes comerciais de *Stylosanthes capitata* em condições de campo em uma área de 2500 m² usando um sistema nomeado de Trop-T-FACE localizado na Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (21° 9' 42.56" S; 47° 50' 47.12" O). O município de Ribeirão Preto (650 km²) situa-se no noroeste do Estado de São Paulo a uma altitude de 546 m, entre as bacias do rio Pardo e Mogi Guaçu. A região apresenta clima com sazonalidade acentuada, com verão quente e chuvoso e inverno seco, com uma média anual da temperatura e precipitação de 22,6 °C e 1.482 mm, respectivamente, e a umidade relativa média é de 71,82% (Kotchetkoff-Henriques, 2003).

4.2 Descrição do sistema Trop-T-FACE (*Temperature free air controlled enhancement and Free-air carbon dioxide enrichment*)

As plantas e sementes deste estudo foram plantadas em condições de campo aberto, usando o sistema *Temperature free air controlled enhancement e Free-air carbon dioxide enrichment* (Trop-T-FACE). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos e quatro repetições, totalizando 16 parcelas experimentais (Figura 7A). As parcelas foram circulares, cada uma com um diâmetro de 2 m, e separadas por cerca de 10 m para minimizar a contaminação cruzada de CO₂ (Figura 7B). Plantas com dois meses de idade foram expostas a quatro tratamentos sob o sistema Trop-T-FACE (Figura 7), sendo eles: 1) **[C] Controle** (temperatura e CO₂ ambiental); 2) **[eCO₂] Elevado CO₂** (concentração de CO₂ elevada a 600 μmol mol⁻¹, 50% acima do [CO₂] ambiental atual), que era armazenado em tanque e fumigado em campo através de anéis (Figura 7B); 3) **[eT]** Elevada temperatura (em +2°C acima da temperatura ambiental), realizado por lâmpadas infravermelhas-IR modelo FTE-1000/1000W, 240 V (Figura 7B) como descrito por Kimball e colaboradores (2008); 4) **[eCO₂+eT]** interação entre elevado CO₂ (600 ppm) e elevada temperatura (+2 °C) e Os tratamentos foram aplicados antes e durante o período de florescimento e frutificação da espécie *Stylosanthes capitata*.

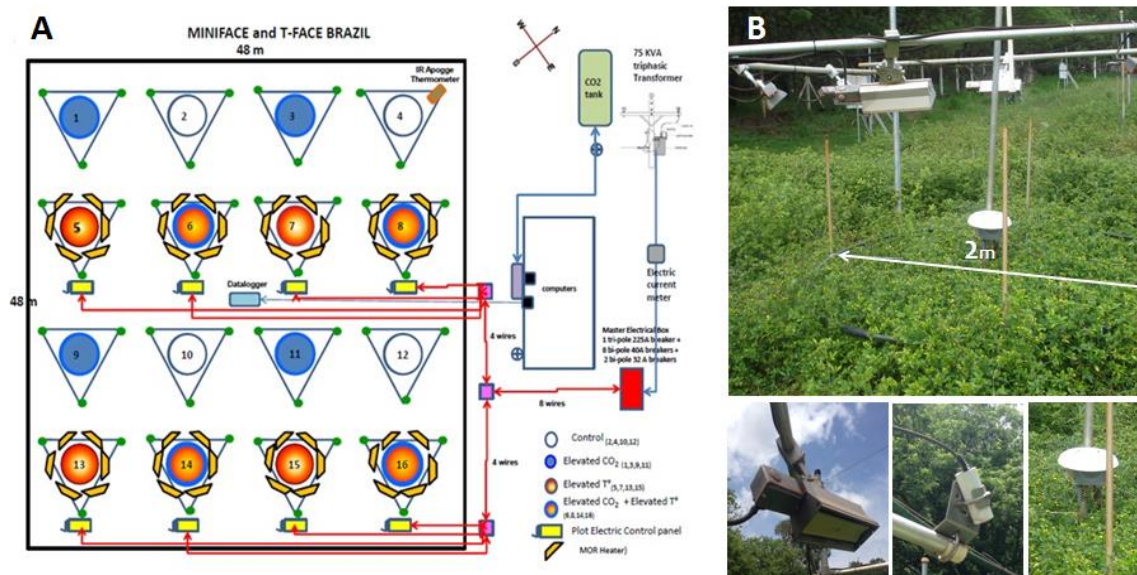


Figura 7. A) Esquema Experimental do Sistema Trop-T-FACE implantado na Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto pelo Projeto Temático FAPESP 2008/58075-8. B) Detalhe das parcelas experimentais cultivadas com *Stylosanthes capitata* e dos aparelhos utilizados para o aquecimento.

O Trop-T-FACE foi uma nova combinação dos sistemas (*free-air carbon dioxide*) e T-FACE (*free-air temperature-controlled enhancement*) estabelecido para simular eventos climáticos futuros relacionados à elevação de CO₂ (600 ppm) e de temperatura (+2 °C). Uma descrição mais detalhada do sistema Trop-T-FACE está disponível em Martinez et al. (2014), Prado et al. (2016), Gonzalez-Meler et al. (2017), Habermann et al. (2019).

O T-FACE permitiu manter a temperatura das parcelas aquecidas em +2 °C acima da temperatura das parcelas controle (Kimball et al., 2008), e consistiu dos seguintes componentes: uma unidade central de controle e armazenamento de dados, 8 unidades de distribuição e controle de energia nas parcelas experimentais cada um com um dímero para ajuste automático da voltagem (Kalglo, EUA), 6 aquecedores infravermelhos de cerâmica modelo FTE-750-240 Salamander Ceramic Infrared Heating Element (Mor Electric, USA) de 750W cada, instalados dentro de refletores de alumínio modelo Salamander ALEX (Mor Electric, EUA), termômetros infravermelhos, fonte de energia elétrica e computador para controle e armazenamento de dados.

A Figura 8 apresenta médias das temperaturas durante todo o período experimental foi de (19.03 °C) no tratamento controle, (19.30 °C) no eC, (21.04 °C) nas parcelas eT e de (21.30 °C) em eC+eC. A diferença de temperatura entre eC e Controle

foi de 0.27°C e entre eT e Controle de 2.01°C , comprovando a boa performance do sistema de aquecimento. A diferença da temperatura observada entre os tratamentos eC e Controle pode estar relacionada ao fechamento estomático das folhas induzidas pelo elevado CO_2 , como verificado por Haberman et al. (2019).

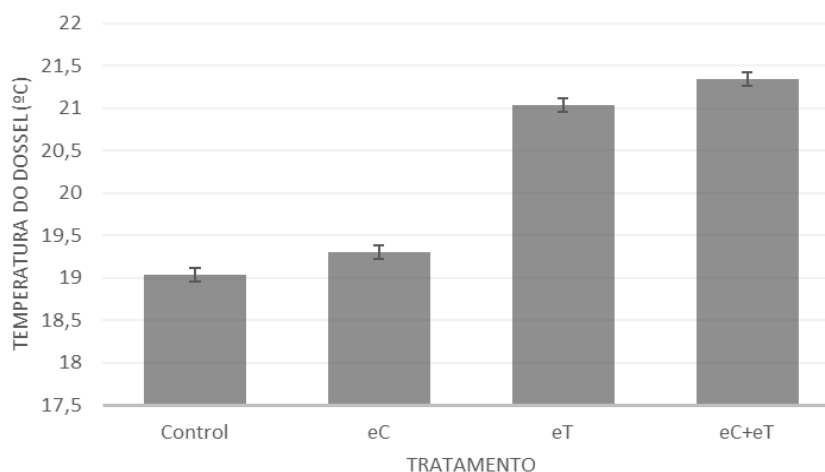


Figura 8. Médias seguidas do erro padrão das temperaturas do dossel nos tratamentos Controle (C), elevado CO_2 (eC), elevada temperatura (eT) e a combinação eC+eT durante o período experimental de 24/04/2015 a 10/06/2015 (Imagem gerada pelo Software Excel).

Já o sistema miniFACE foi uma modificação da fumigação de CO_2 puro POPFACE descrita por Miglietta et al. (2001). Anéis de PVC de dois metros de diâmetro com micro-orifícios perfurados rodearam cada parcela através dos quais o CO_2 foi liberado no dossel da planta. Localizado no centro de cada parcela, posicionou-se um sensor modelo GMT222 (Vaisala, Helsinque, Finlândia) utilizado para avaliar a $[\text{CO}_2]$. Uma unidade de controle central regulava a quantidade de CO_2 necessária para elevar o $[\text{CO}_2]$ ao ponto de ajuste de 600 ppm. Um tanque criogênico de 12 toneladas com CO_2 líquido (-180°C) e uma unidade de vaporizador forneciam o CO_2 gasoso. Anéis fictícios de PVC sem furos também foram colocados em parcelas Controle. A média diária de $[\text{CO}_2]$ nas parcelas ambientais $[\text{CO}_2]$ foi de 395 ± 15 ppm, enquanto a fumigação FACE aumentou a média diurna $[\text{CO}_2]$ para 595 ± 20 ppm nas parcelas de eC e eC + eT durante o experimento. Embora a fumigação de CO_2 não ocorreu à noite, a média noturna $[\text{CO}_2]$ foi de 455 ± 19 ppm devido à respiração heterotrófica da planta e do solo.

No centro do sistema Trop-T-FACE foi instalada uma estação microclimática automática com sensores específicos conectados a um datalogger DL2e (Delta-T

Devices Ltd., Cambridge, Reino Unido). Assim, as variáveis microclimáticas (incluindo temperatura do ar, radiação solar total e umidade relativa), bem como a temperatura do solo (dados não mostrados) e o teor volumétrico de água no solo (SWC, medidos de 0 a 10 cm de profundidade) em cada parcela foram monitoradas a cada hora durante todo o experimento. Na Figura 9 esquematiza as variações da umidade do solo até um valor máximo de $0,50 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ e mínimo de $0,32 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$, nos tratamentos com elevado CO_2 (eC) e eC+eT. No tratamento com elevada temperatura (eT), os valores máximos e mínimos da umidade do solo foram $0,48 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ e $0,25 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$, respectivamente.

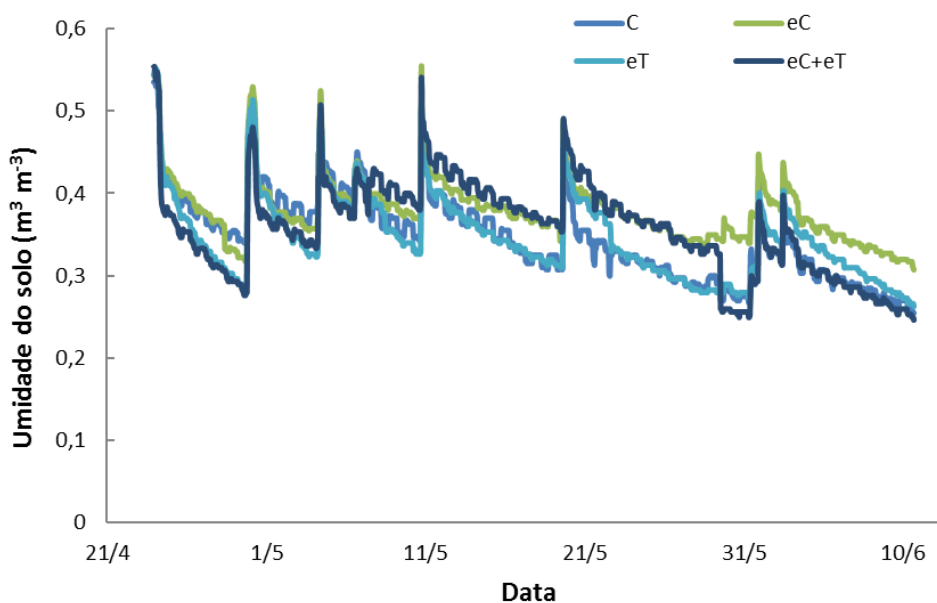


Figura 9. Variação da umidade do solo nos tratamentos Controle (C), elevado CO_2 (eC), elevada temperatura (eT) e a combinação eC+eT durante o período experimental de 24/04/2015 a 10/06/2015 (Imagem gerada pelo Software Excel).

4.3 Coleta das plantas matrizes

As plantas matrizes foram previamente identificadas em campo experimental no início dos tratamentos (Figura 10A). Foram coletadas um total de 10 plantas por tratamento. A coleta foi realizada ao final do mês de julho e início de agosto de 2015, no período de 9-12 semanas após a antese da primeira flor, conforme sugerido por De Castro e colaboradores (1994). Neste período, as inflorescências encontravam-se maduras com coloração amarelada, apresentando poucas folhas e caule esverdeado (Figura 10B e C). Os tecidos foliares foram amostrados das plantas matrizes e armazenados a -20°C até o momento da extração do DNA. Para obtenção das progênies, sementes foram retiradas manualmente das inflorescências de plantas matrizes previamente identificadas (Figura 10C, D e E).



Figura 10. A) Aspecto da planta matriz em campo. B) Aspecto de uma planta madura, no momento de sua coleta em campo. C) Aspecto visual das inflorescências maduras. D) Vagens extraídas das inflorescências maduras (aumento 4x). E) Semente retirada da vagem após leve escarificação de seu tegumento (aumento 4x). (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2015, 2016).

4.4 Análises de sementes

4.4.1 Mortalidade, produtividade e peso de sementes

Para avaliar se os tratamentos influenciaram a produção e mortalidade de sementes, dez vagens de cada planta matriz (Figura 10D) foram retiradas manualmente. Foram avaliados o número de sementes por inflorescência, o número de vagens vazias (%) e o número de sementes mortas (%). As sementes mortas foram substituídas por sementes visualmente sadias e o peso de 100 sementes foi avaliado (mg).

4.4.2 Coloração do tegumento das sementes

Cem sementes saudáveis de cada planta matriz (4 por repetição, 16 por tratamento, totalizando 1.600 sementes por tratamento) foram analisadas visualmente em lupa (Aumento 4x) e classificadas quanto à coloração do seu tegumento. Os dados foram mensurados em número de sementes observadas por classe de coloração e os resultados expressos em porcentagem (%) e frequência média.

4.4.3 Germinação

Foi utilizada uma mistura de 100 sementes de três plantas matrizes (coletadas de cada parcela do campo experimental), totalizando 400 sementes por tratamento. Para os testes de germinação *in vitro*, as sementes de aspecto sadio (Figura 10E) foram dispostas sobre papel filtro em placas de Petri previamente autoclavadas (Figura 11A).

O papel filtro foi embebido com água destilada estéril e umedecido novamente, sempre que necessário ao longo do experimento (Figura 11B).

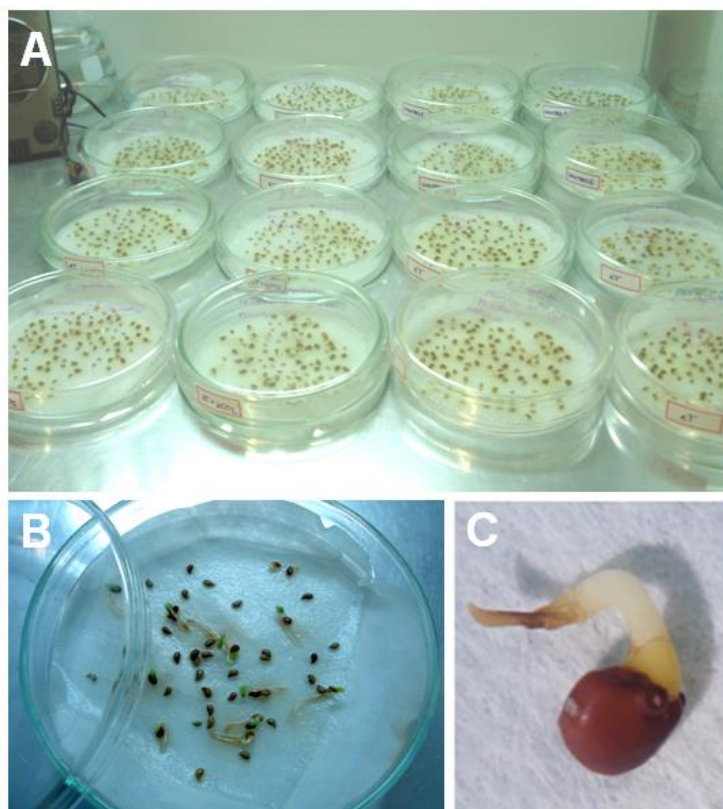


Figura 11. A) Experimento de germinação *in vitro* da mistura de sementes de *S. capitata* de plantas matrizes de cada uma das 16 parcelas. B) Detalhe das plântulas em processo de germinação em placa de Petri. C) Semente de *S. capitata* no início da germinação. (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2015, 2016).

As sementes foram submetidas a foto-período de 12 horas, com temperatura média de 27,4°C e umidade relativa de 45,7%, respectivamente, no Laboratório de Genética Vegetal. Nestas condições, a germinação foi avaliada diariamente durante sete dias, obtendo-se dados percentuais relativos à contagem de sementes germinadas por dia. A germinação das sementes foi avaliada conforme indicado nas Regras para Análise de Sementes (Brasil - MAPA, 2009).

Os parâmetros utilizados para avaliar a germinação foram: 1) O índice de velocidade de germinação (IVG), calculado pela fórmula de Maguire (1962) e expresso em sementes germinadas por dia (sementes/dia); 2) A germinabilidade total (%), indicada pelo número de sementes germinadas no último dia do experimento/total de sementes* 100 (Ferreira e Borghetti, 2004).

4.4.4 Avaliação visual da qualidade das plântulas germinadas

Para esta avaliação, as plântulas foram contadas e classificadas como: 1) PN - plântulas normais que apresentaram estruturas morfológicas bem desenvolvidas e outras normais mais de menor tamanho e vigor e 2) PA - plântulas anormais que apresentavam caulículo retorcido, coloração dos cotilédones amarelada e com o tamanho do broto significativamente menor que o observado em plântulas consideradas saudáveis (Figura 10). Os dados foram mensurados em número de plântulas observadas por classe (PN, PA e NG) e os resultados expressos em frequência.



Figura 12. Morfologia das plântulas desenvolvidas após germinação *in vitro*. A) Plântulas com maior vigor. B) Plântulas normais de tamanho médio. C) Plântulas anormais (tamanho pequeno, cor amarelada, caulículo retorcido) (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2016).

4.5 Análises de diversidade genética e taxas de cruzamento

4.5.1 Obtenção das famílias, extração e quantificação do DNA

Para obtenção das famílias, 16 sementes de aspecto sadio (Figura 10E) foram retiradas das inflorescências de 10 plantas matrizes (de cada tratamento), previamente selecionadas em campo, mantendo sempre a informação das mães vs. progênies. As sementes foram escarificadas manualmente com lixa fina (220 gr) e colocadas para germinar em Placas de Petri (vide detalhes no item 4.4.2).

As plântulas crescidas sadias foram coletadas e armazenadas a -20°C até a extração do seu DNA. O DNA genômico total foi extraído das folhas congeladas das plantas matrizes adultas ($n=40$) e da população das progênies a partir de amostras cotiledonares

frescas (n=640), utilizando o método descrito por Alzate-Marin et al. (2009). A quantificação do DNA total extraído foi realizada em NanoDrop (ThermoScientific) e a qualidade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2%, tal como demonstrado na Figura 13.

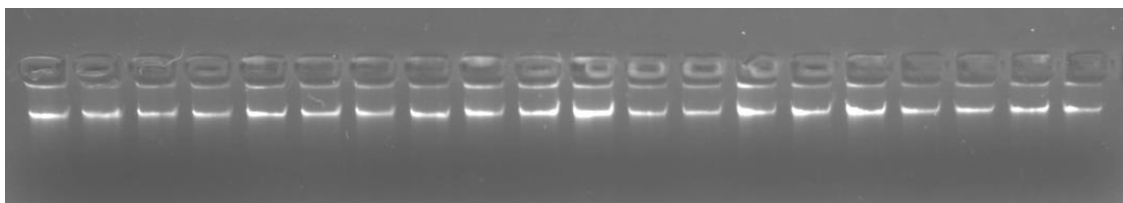


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% do DNA genômico extraído de algumas amostras de plântulas obtidas após germinação das sementes. (Foto: Laboratório Genética Vegetal – USP/RP, 2016).

4.5.2 Padronização dos marcadores microssatélites e amplificação das famílias

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador (Eppendorf), nas seguintes condições: 2 µl de DNA genômico, em um volume total de 5 µl de GoTaqColorless Master Mix, 5 µl de Nuclease-FreeWater (Promega) (*Taq*DNA polymerase fornecida em tampão de reação [pH 8.5] 2x incolor, 400µL, dATP, 400µL dGTP, 400µL dCTP, 400µL dTTP e 3mM MgCl₂) e 1 µl de cada primer (SSR). Quinze marcadores microssatélites (SSR) previamente desenvolvidos para *S. capitata* (Santos et al., 2009; Santos-Garcia et al., 2011) foram testados e padronizados para obtenção das melhores condições de amplificação para as amostras da população de plantas matrizes (Alzate-Marin et al, 2019 - Artigo 1, em Anexos).

Para amplificação do DNA das famílias foram escolhidos sete marcadores, que apresentaram alelos polimórficos e boa qualidade de amplificação das bandas, quando corridos em géis de poliacrilamida, conforme ilustrado na Figura 14. Os loci foram amplificados de acordo a seguinte programação: 1 ciclo a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, temperaturas específicas entre 55-60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, 1 ciclo a 72 °C por 7 minutos. A Tabela 1 apresenta a descrição e temperaturas de anelamento dos sete marcadores selecionados.

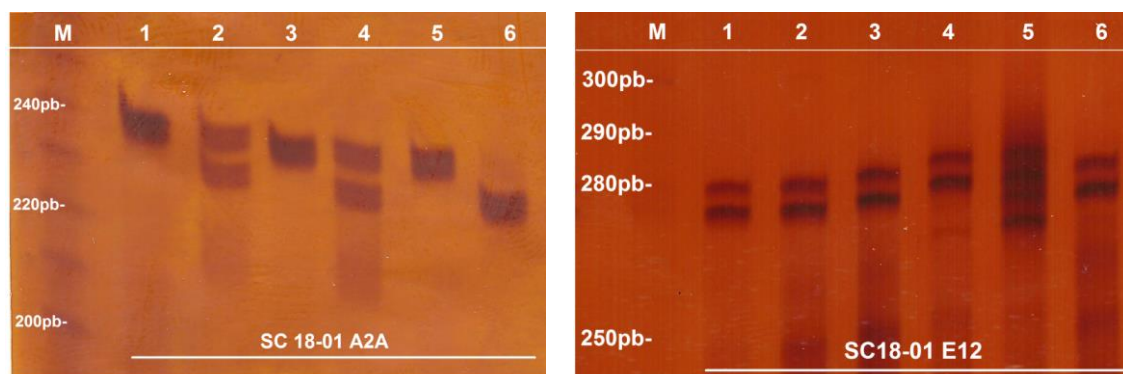


Figura 14. Gel de poliacrilamida 8% não desnaturante, mostrando os produtos de amplificação do DNA de 5 indivíduos da espécie *Stylosanthes capitata* com 2 marcadores escolhidos para estudos de diversidade genética e taxas de cruzamento.

Tabela 1. Sete loci microssatélite utilizados na amplificação das famílias de *S. capitata*, desenvolvidos por Santos et al. (2011).

Loci	Primer Forward e Reverse	Tamanho do fragmento (pb)	Elemento Repetitivo
SC 18-01 A2A	5' AGCAGCATAGGGAATAAAAAT 3' 5' CAAAGGCCTAATCAACTGTG 3'	232-238	(TC)5(AC)5
SC 18-01 F2	5' CTGACCCACCTAATGAGAAA 3' 5' AGCAAAACAAAACAAACAACACTA 3'	196-198	(TG)7
SC 18-01 E12	5' TGGAGACAACACCCTTATG 3' 5' ATTCTATTACTCTTGCCTTTTCT 3'	270-305	(GA)5
SC 18-01 E4	5' CGGCAACTGGGAAAAATAA 3' 5' ATGGGTAATCACAAATCTTCAG 3'	300-310	(CA)3CT(CA) 5
SC 18-01T G9	5' TCCAGCTAAAGGGCAACACA 3' 5' CCACCGCACACCAGAGATT 3'	242-245	(GAA)7
SC 18-01T G12A	5' ATGCTGATTTTTGGCTCTTTT 3' 5' CCCTTTTGAACGGATTG 3'	240-260	(ATGGTA)5
SC 18-01 H5	5' GCATCATTTGCATTTGTTTT 3' 5' CTATCACCTCTCCATACCTTATC 3'	192-196	(TG)9

4.5.3 Eletroforese capilar em Gelbot

As eletroforeses dos produtos da PCR das famílias foram realizadas no sistema automatizado de eletroforese capilar GelBot® (Loccus-BioOptic Inc.), utilizando cartucho de alta resolução (capaz de separar fragmentos de 2 a 1000 pb). Para análise dos dados obtidos, utilizou-se o software Q-Analyzer (BioOptic Inc.). A Figura 15 contém as imagens dos picos (A) e as respectivas bandas (B) após eletroforese capilar no sistema GelBot®, para dois marcadores. Os pares de primers A2A/E4, G9/F2, G12/H5 e E12 foram avaliados.

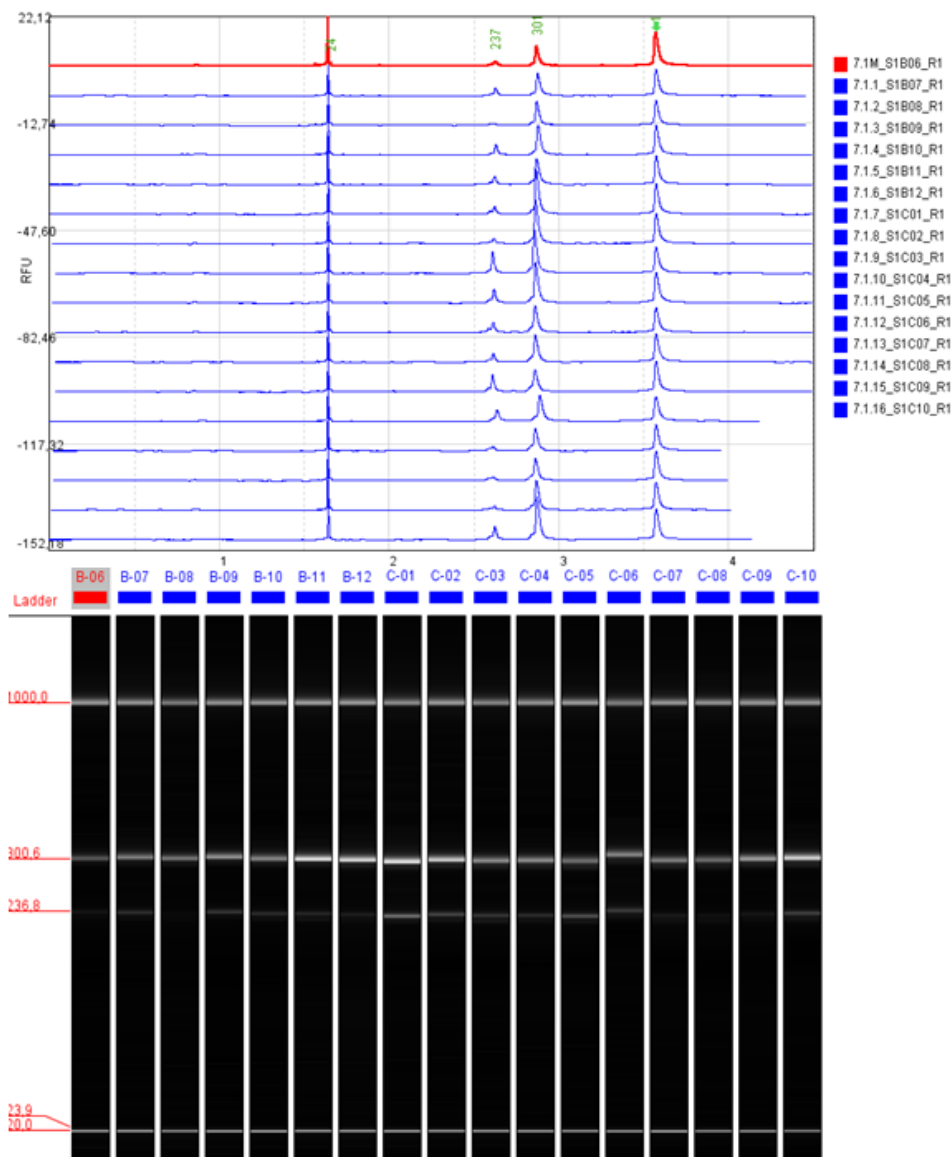


Figura 15. Picos de amplificação e imagem representativa dos géis dos produtos de PCR com os marcadores A2A (Pico de 237pb ~ 240pb) e E4 (Pico de 300pb) após eletroforese capilar no sistema GelBot. Marcadores de tamanho molecular de 20pb e 1000pb. Amostras da matriz de *S. capitata* em vermelho e de suas progênes em azul (Imagens geradas pelo Software GelBot).

4.6 Análises estatísticas

4.6.1 Teste de Normalidade, Teste T e Análise de Variância Fatorial 2x2

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, considerando $p < 0,05$. Os parâmetros analisados nesta pesquisa tiveram distribuição normal, de forma que a diferença entre os grupos pôde ser avaliada pelo teste Análise de Variância Fatorial (paramétrico). O efeito dos tratamentos em cada um dos parâmetros analisados foi testado pela Análise de Variância Fatorial (Dois Fatores). O primeiro fator foi a elevação de CO₂ (eCO₂) e o segundo a elevação de temperatura (eT), tendo

cada um deles dois níveis: (ausência e presença de eCO₂, ausência e presença de eT), de forma a configurar os 4 grupos experimentais (C: ausência de eCO₂ e ausência de eT; eCO₂: presença de eCO₂ e ausência de eT; eT: ausência de eCO₂ e presença de eT, eCO₂+eT: presença de eCO₂ e presença de eT).

O teste t-Student foi utilizado para comparar as médias dos parâmetros de diversidade genética entre as populações de matrizes e progênies, considerando $p < 0,05$. O teste do Qui-Quadrado de aderência foi utilizado para testar a hipótese de que, os diferentes tratamentos exerceriam efeito sobre a distribuição do número de sementes nas diferentes classes de coloração do tegumento. Considerou-se o valor de $p < 0,05$ para aceitação da hipótese alternativa (H_1 = número absoluto de sementes observadas cada classe é diferente do número de sementes esperadas nos tratamentos).

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando ferramentas dos softwares Excel e GraphPadPrism v.8.0.

4.6.2 Diversidade genética, endogamia e equilíbrio de Hardy-Weinberg

A variabilidade genética inter e intra-populacional em cada uma das espécies foi determinada a partir do cálculo das frequências alélicas e de índices de diversidade: número de alelos por loco (A), número de alelos efetivos (A_e), heterozigosidade observada (H_o) heterozigosidade esperada (H_e), calculados com o auxílio do software GeneAlex v. 6.4.1 (Peakall e Smouse 2006). Os índices de heterozigosidade observada e esperada foram comparadas segundo as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), pelo teste do qui-quadrado de aderência para cada *locus*, pelo teste exato de Fisher, com o software GenePop v.4.7 (Rousset, 2008).

Os parâmetros de Nei para o estudo da estrutura genética de um grupo subdividido podem ser aplicados sem considerar o número de alelos por locus ou as forças evolutivas (Nei, 1973). O índice de diferenciação genética F_{st} (Nei, 1977) foi calculado para verificar diferenças entre os tratamentos, seguido do teste exato de Fisher, que comprova a significância dessa estruturação. Ambas as análises foram realizadas pelo software GenePop v.4.7 (Rousset, 2008).

4.6.3 Parâmetros de taxas de cruzamento

O modelo proposto por Ritland e Jain (1981) é o mais utilizado para estimativas das taxas de cruzamento em espécies de cruzamento misto, leva em conta as autofecundações (s) e os cruzamentos aleatórios (t). As premissas estabelecidas por

estes autores são: 1) homogeneidade no conjunto de pólen com todos os genótipos maternos; 2) ausência de eventos de seleção e/ou mutação entre momento reprodutivo e o momento da análise dos dados; 3) segregação independente dos alelos. Para testar a premissa da segregação independente dos alelos foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação para os *locus* escolhidos, utilizando o software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). As probabilidades do teste foram obtidas após 1680 permutações. Utilizou-se nível designificância de $p < 0,05$ para análise das probabilidades.

O sistema de reprodução foi caracterizado pelos modelos misto de reprodução (Ritland e Jain, 1981) e cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989). Em espécies com sistema misto de reprodução, as estimativas das taxas de cruzamento são calculadas com base nos genótipos multiloco, analisados em plantas matrizes e suas progênes (Ritland e Jain, 1981). Nesta pesquisa estimaram-se: (1) taxa de cruzamentos multiloco e uniloco, (2) taxa de cruzamento entre aparentados, (3) taxa de cruzamento multiloco individual por planta matriz, (4) correlação de autofecundação, (5) correlações multiloco e uniloco de paternidade. O erro padrão dos parâmetros foram estimados por 1000 reamostragens *bootstrap*, obtidas utilizando o programa MLTR (Ritland, 2002; Ritland, 2004).

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do aquecimento, da elevação de CO₂ e da sua interação na produção, coloração e germinação de sementes da espécie *S. capitata*

Número de vagens vazias (abortos) e de sementes inviáveis. Não houve efeito significativo dos tratamentos no parâmetro porcentagem de vagens vazias ($p > 0,05$, Tabela 2), porém a elevação da temperatura teve efeito significativo sobre a porcentagem de sementes inviáveis ($*p < 0,05$, Tabela 2).

Tabela 2. Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros porcentagem de vagens vazias e de sementes mortas nos diferentes tratamentos. Valores expressos em média, seguidos de erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem de variação.

Porcentagem de vagens vazias (%)			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	9,75 ± 1,35	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	8,06 ± 0,85	F = 0,00; $p = 0,98$	0,00
Elevada Temperatura (eT)	5,56 ± 1,56	F = 2,10; $p = 0,17$	13,88
Interação (eCO ₂ +eT)	7,31 ± 2,58	F = 1,02; $p = 0,33$	6,73
Porcentagem de sementes inviáveis (%)			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	15,62 ± 3,32	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	12,25 ± 2,58	F = 0,08; $p = 0,78$	0,38
Elevada Temperatura (eT)	6,69 ± 1,40	F = 7,14; $p = 0,02^*$	34,66
Interação (eCO ₂ +eT)	8,75 ± 1,36	F = 1,36; $p = 0,26$	6,62

A porcentagem média de vagens vazias em plantas das parcelas controle foi a maior, média de 9,75%. Cerca de 8,06% das plantas oriundas da parcela com eCO₂ apresentaram vagens vazias. Nos tratamentos aquecidos houve uma pequena redução significativa nesta porcentagem: só 5,56% das plantas do tratamento eT tiveram abortos e 7,31% das plantas do tratamento eCO₂+eT.

No tratamento controle, uma média de 15,62% do total de sementes estavam secas e mortas. No tratamento com elevação de CO₂, essa porcentagem foi similar, onde sementes secas constituíam 12,25% do total de sementes. A porcentagem média de sementes mortas reduziu para 8,75% nas parcelas com combinação de aquecimento e elevação de CO₂ (eCO₂+eT). No entanto, a única redução estatisticamente significativa

($p < 0,05$, Tabela 2), foi observada no tratamento eT, onde observaram-se somente 6,69% de sementes secas e mortas, ou seja, uma redução de 2.3x vezes em relação ao controle.

Número de sementes por inflorescência (produtividade) e peso de sementes.

O tratamento com elevação de temperatura exerceu efeito significativo sobre o número médio de sementes por inflorescência ($***p < 0,001$, Tabela 3), enquanto que os demais tratamentos não afetaram significativamente este parâmetro. Nas famílias submetidas as condições ambientais Controle, o número médio de sementes por inflorescência foi de $14,12 \pm 1,24$. Valores similares ao observado nas plantas de *S. capitata* submetidas a elevação de CO_2 , que foi de $15,05 \pm 0,46$ sementes por inflorescência (Tabela 3). Plantas submetidas ao tratamento com elevação de temperatura (eT) apresentaram uma média de $20,62 \pm 1,18$ sementes por inflorescência, valor estatisticamente maior que o observado nos demais tratamentos ($***p < 0,001$, Tabela 3) e elevação de temperatura sendo responsável por 68,10% da variação no número de sementes por inflorescência observado. O número médio de sementes produzidas por inflorescência nas plantas das parcelas com e CO_2 +eT foi ligeiramente maior ($19,50 \pm 1,08$) que o número médio observado em plantas das parcelas C e e CO_2 , entretanto este aumento não foi estatisticamente significativo.

Tabela 3. Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros número de sementes por inflorescência e peso de cem sementes (mg) nos diferentes tratamentos. Valores expressos em média, seguidos de erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem de variação.

Número médio de sementes por inflorescência			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$14,12 \pm 1,24$	-	-
Elevado CO_2 (e CO_2)	$15,05 \pm 0,46$	F = 0,00; $p = 0,92$	0,02
Elevada Temperatura (eT)	$20,62 \pm 1,18$	F = 27,71; $p = 0,00***$	68,10
Interação (e CO_2 +eT)	$19,50 \pm 1,08$	F = 0,97; $p = 0,34$	2,39
Peso de cem sementes sadias (mg)			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$230,47 \pm 14,57$	-	-
Elevado CO_2 (e CO_2)	$240,52 \pm 5,09$	F = 0,00; $p = 0,95$	0,03
Elevada Temperatura (eT)	$230,62 \pm 9,03$	F = 1,19; $p = 0,30$	8,26
Interação (e CO_2 +eT)	$219,25 \pm 7,44$	F = 1,22; $p = 0,29$	8,46

Não houve efeito significativo dos tratamentos no peso médio de 100 sementes ($p>0,05$, Tabela 3). Verifica-se que o peso médio de 100 sementes do tratamento controle foi de $230,47 \pm 14,57\text{mg}$. Sementes oriundas do tratamento com elevação de CO_2 apresentaram ligeiro aumento no peso médio de 100 sementes ($240,52 \pm 5,09\text{mg}$), enquanto que a interação de $e\text{CO}_2$ e $e\text{T}$ apresentou um menor peso médio de 100 sementes ($219,25 \pm 7,44\text{ mg}$) (Tabela 3).

Coloração do tegumento das sementes. As classes de coloração identificadas após análise visual em lupa foram: verde, bege lisa, bege rajada, marrom, marrom rajada ou preta (Figura 16).



Figura 16. Diferentes tonalidades do tegumento das sementes de *Stylosanthes capitata* utilizadas para classificação da coloração (Aumento de 4x). (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2016).

Em todos os tratamentos, a coloração bege rajada foi a mais frequente (Figura 17). Nos tratamentos aquecidos ($e\text{T} = 5,94 \pm 1,15\%$ e $e\text{CO}_2 + e\text{T} = 5,94 \pm 0,97\%$) evidencia-se uma redução significativa da porcentagem de sementes de coloração marrom lisa quando comparados ao C ($24,25 \pm 4,15\%$) e eC ($24,87 \pm 3,64\%$) (** $p<0,01$, Figura 17).

Por outro lado, as parcelas aquecidas apresentaram maior porcentagem de sementes de tegumento bege rugoso ($e\text{T} = 69,37 \pm 5,21\%$; $e\text{CO}_2 + e\text{T} = 66,70 \pm 5,21\%$), quando comparadas com os tratamentos C ($36,25 \pm 3,72\%$) e $e\text{CO}_2$ ($34,06 \pm 6,53\%$) (** $p<0,001$, Figura 17). Nas demais classes de coloração do tegumento, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$, Figura 17).

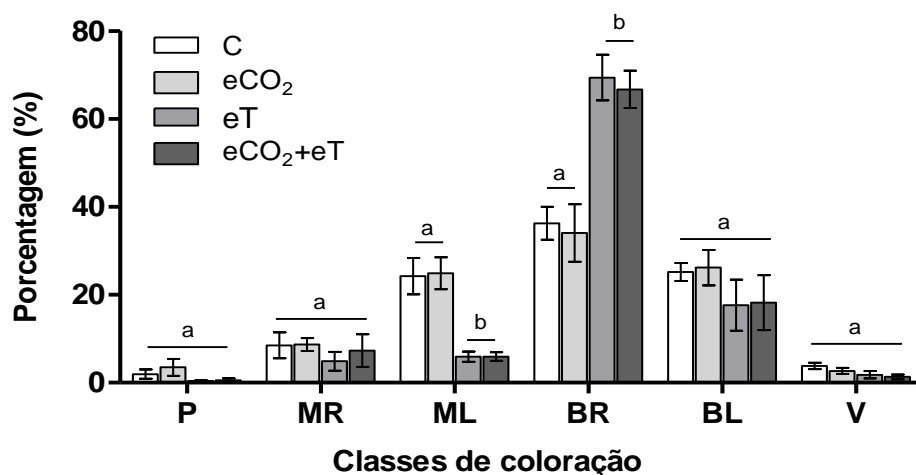


Figura 17. Porcentagem de sementes em cada classe de coloração do tegumento, em cada um dos tratamentos. As colunas representam o valor percentual médio e as barras verticais mostram o erro padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos após teste ANOVA-Fatorial. Legenda - P: Preta, MR: Marrom Rajada, ML: Marrom Lisa, BR: Bege Rajada, BL: Bege Lisa, V: Verde. (Imagem gerada pelo software GraphPad Prism v7.0).

Verificou-se que as proporções observadas diferem estatisticamente ($\chi^2=854,80$, $***p < 0,001$, Tabela 4) das proporções esperadas em uma distribuição normal dentro das classes de coloração, indicando que os tratamentos influenciaram a distribuição das sementes dentro das diferentes classes de coloração.

Tabela 4. Número absoluto de sementes de *Stylosanthes capitata* por classe de coloração do tegumento nos diferentes tratamentos. Legenda - P: Preta, MR: Marrom Rajada, ML: Marrom Lisa, BR: Bege Rajada, BL: Bege Lisa, V: Verde.

Tratamentos	Classes de coloração do tegumento da semente					
	P	MR	ML	BR	BL	V
C	31	136	388	580	403	62
eCO ₂	56	139	398	545	419	43
eT	6	78	95	1110	283	28
eCO ₂ +eT	9	117	95	1067	291	21
Total	35	383	535	2125	816	106

χ^2 Calculado = 854,80, χ^2 Tabelado ($\alpha=0,05$) = 25, $***p=0,0001$

Germinabilidade e índice de velocidade de germinação. Não houve efeito significativo dos tratamentos nos parâmetros germinabilidade e velocidade de germinação ($p > 0,05$, Tabela 5). A germinabilidade de sementes produzidas nas parcelas Controle foi de 89,11%, ligeiramente menor que a observada em sementes dos demais

tratamentos (entre 93-94%, Tabela 5). A velocidade de germinação também foi similar entre os grupos experimentais, variou de 45,08 sementes/dia (nas sementes crescidas nas parcelas controle), a 48,03 sementes/dia nas sementes dos tratamentos eCO₂+eT, sendo 52,82 sementes/dia nos tratamentos eT e média de 53,93 sementes/dia em eCO₂ (Tabela 5).

Tabela 5. Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros germinabilidade (%) e índice de velocidade de germinação médio (IVG) de sementes da espécie *S. capitata* dos diferentes grupos experimentais. Média seguida de erro padrão (entre parênteses).

Germinabilidade total (%)			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	89,11 ± 3,52	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	94,96 ± 2,04	F = 0,31; <i>p</i> = 0,59	2,50
Elevada Temperatura (eT)	94,00 ± 1,41	F = 0,00; <i>p</i> = 0,93	0,07
Interação (eCO ₂ +eT)	93,17 ± 0,29	F = 1,27; <i>p</i> = 0,28	10,15
Índice velocidade de germinação (sementes/dia)			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	45,08 ± 2,84	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	53,93 ± 5,27	F = 0,01; <i>p</i> = 0,71	0,96
Elevada Temperatura (eT)	52,82 ± 5,16	F = 0,12; <i>p</i> = 0,73	0,83
Interação (eCO ₂ +eT)	48,03 ± 2,06	F = 2,40; <i>p</i> = 0,15	16,33

A Figura 18 retrata as sementes dos diferentes grupos experimentais 24 horas após o início da germinação. No primeiro dia de experimento, a propulsão radicular ocorreu em 33,50% das sementes crescidas nas parcelas C, em 27,00% das sementes das parcelas eC, em 53,50% das sementes eT e 50,50% das sementes eCO₂+eT. 168 horas após o início do teste de germinação.

A Figura 19 apresenta o aspecto visual das sementes no último dia do experimento (168 horas). Em todas as parcelas, a germinação foi próxima ou superior a 90% do total de sementes.

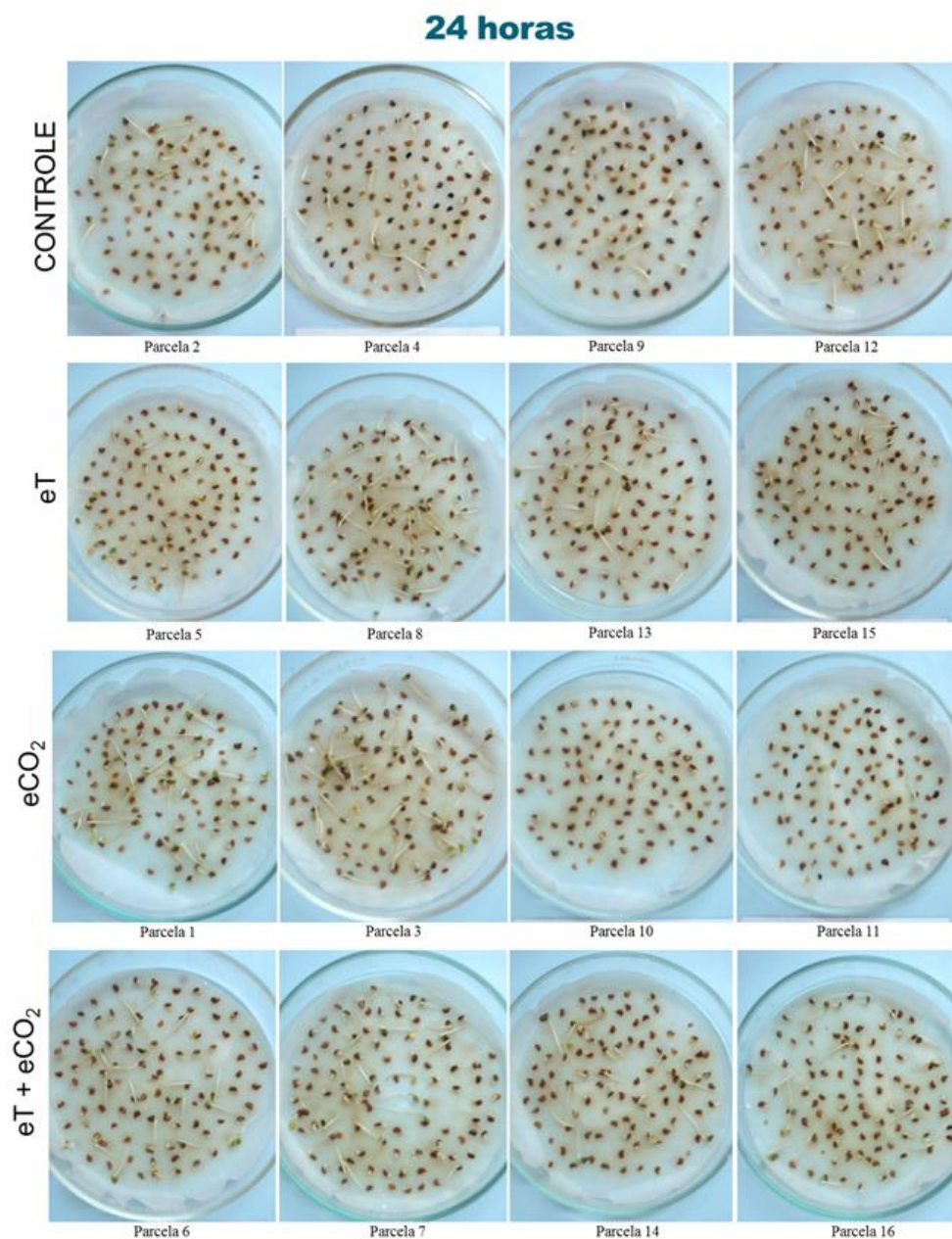


Figura 18. Aspecto das sementes dos diferentes tratamentos 24 horas após o início do experimento de germinação. (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2016).

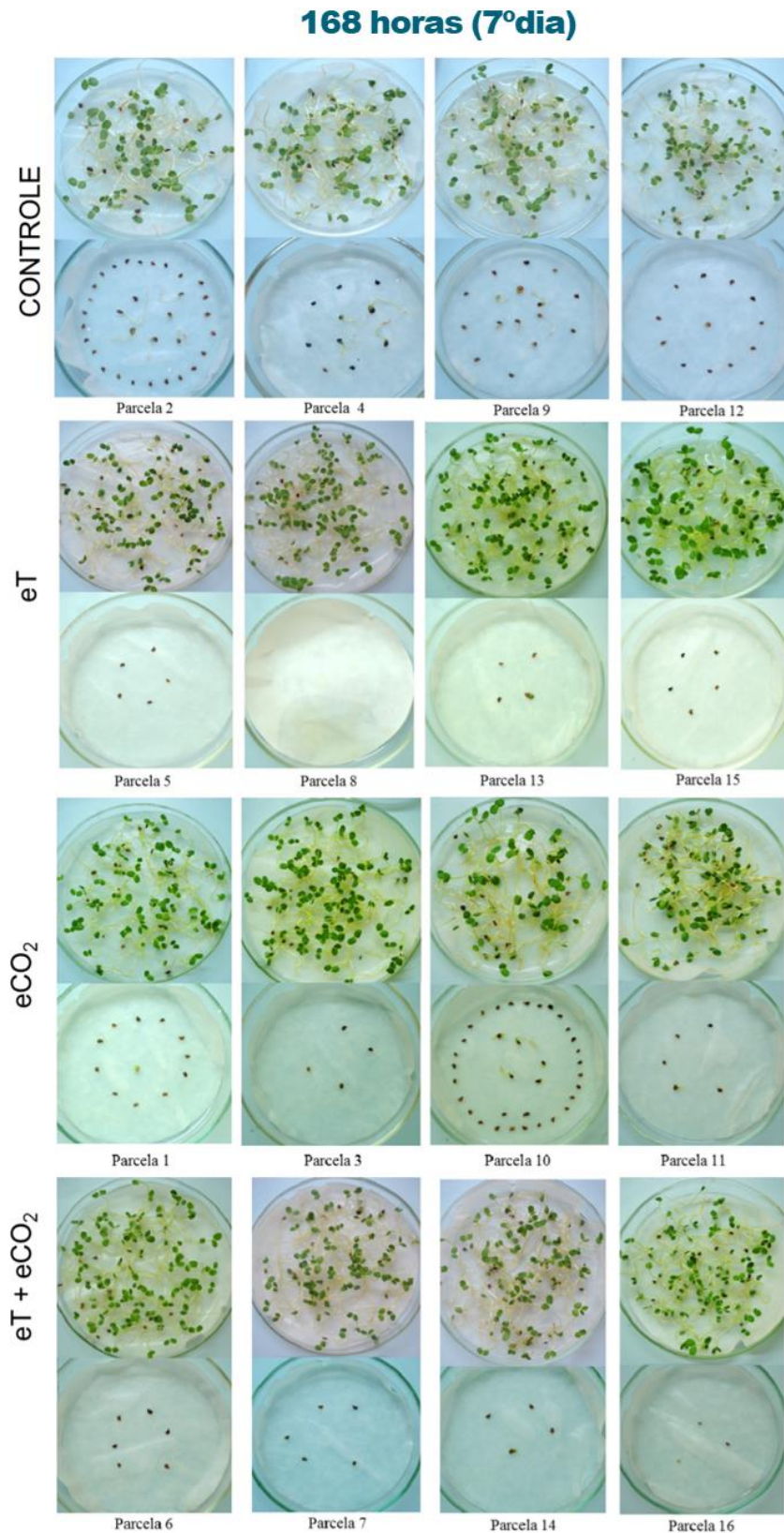


Figura 19. Aspecto das plântulas dos diferentes tratamentos 168 horas (7 dias) após o início do experimento de germinação. Acima: Placas de Petri contendo plântulas germinadas. Abaixo: sementes que não germinaram (Fotos: Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP, 2016).

Avaliação visual da qualidade das plântulas germinadas. A elevação de temperatura exerceu efeito significativo sobre a germinação normal de sementes (** $p < 0,01$, Tabela 6), sendo responsável por 64,77% da alteração total observada neste parâmetro. Foram consideradas com germinação normal (vide Figura 12) um total de $76,00 \pm 3,14\%$ das sementes provenientes dos tratamentos controle e $79,50 \pm 4,79\%$ das sementes oriundas de eC. Uma porcentagem estatisticamente maior (** $p < 0,01$, Figura 20) que a porcentagem observada em C e eC foi encontrada nos tratamentos com aquecimento (eT = $94,75 \pm 1,80\%$ e eCO₂+eT = $91,50 \pm 1,76\%$).

Tabela 6. Índice de velocidade de germinação médio (IVG) e germinabilidade (%) de sementes da espécie *S. capitata* nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média, seguidos de erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p: nível de significância, porcentagem de variação.

Germinação normal (%)			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$76,00 \pm 3,14$	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	$79,50 \pm 4,79$	F = 0,00; p = 0,97	0,00
Elevada Temperatura (eT)	$94,75 \pm 1,80$	F = 24,21; p = 0,00***	64,77
Interação (eCO ₂ +eT)	$91,50 \pm 1,76$	F = 3,12; p = 0,30	3,12
Germinação anormal (%)			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$5,50 \pm 1,55$	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	$9,00 \pm 1,68$	F = 5,54; p = 0,03*	21,45
Elevada Temperatura (eT)	$1,50 \pm 0,50$	F = 8,27; p = 0,01*	32,04
Interação (eCO ₂ +eT)	$4,75 \pm 1,65$	F = 0,01; p = 0,93	0,03
Não germinadas (%)			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$18,50 \pm 4,65$	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	$11,25 \pm 5,24$	F = 0,96; p = 0,35	4,03
Elevada Temperatura (eT)	$3,75 \pm 1,31$	F = 9,93; p = 0,00**	41,64
Interação (eCO ₂ +eT)	$3,75 \pm 0,48$	F = 0,96; p = 0,34	4,03

A elevação temperatura e a elevação de CO₂ exerceram efeito significativo sobre a germinação anormal das sementes (* $p < 0,05$, Tabela 6). A germinação anormal (vide Figura 12) ocorreu em $5,50 \pm 1,55\%$ das sementes oriundas das parcelas controle. A elevação de CO₂ aumentou significativamente a porcentagem de sementes com

germinação anormal ($9,00 \pm 1,68\%$) ($*p < 0,05$), enquanto que a com elevação de temperatura (eT) reduziu significativamente essa porcentagem ($1,50 \pm 0,50\%$, $*p < 0,05$). Um valor similar ao observado no Controle foi evidenciado nas sementes das parcelas da interação (eCO₂+eT = $4,75 \pm 1,65\%$) (Figura 20).

A elevação de temperatura exerceu efeito significativo sobre a porcentagem de sementes que não germinaram ($**p < 0,01$, Tabela 6), sendo significativamente menor nos tratamentos aquecidos eT ($3,75 \pm 1,31\%$) e eCO₂+eT ($3,75 \pm 0,48\%$) que nos tratamentos C ($18,50 \pm 4,65\%$) e com elevação de CO₂ ($11,25 \pm 5,24\%$) (Figura 20).

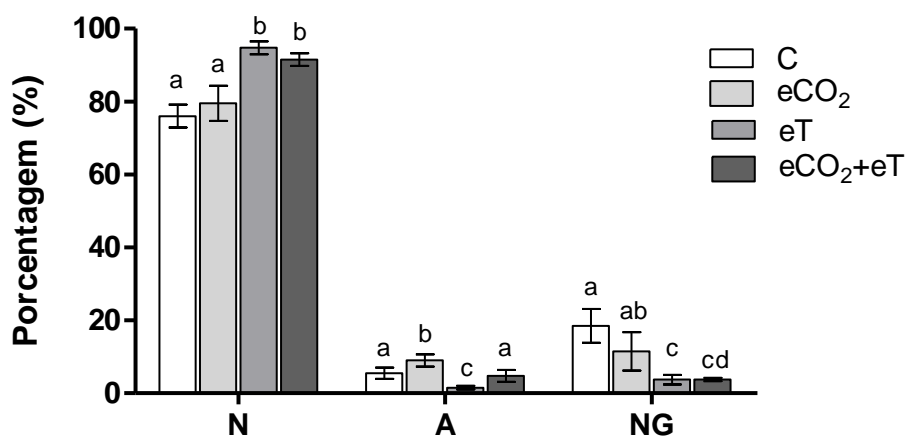


Figura 20. Distribuição da característica qualidade das plântulas germinadas nos diferentes tratamentos. Colunas brancas GN: Germinação normal, colunas cinza-claro GA: Germinação anormal e colunas cinza escuro NG: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($*p < 0,05$) entre os tratamentos após teste ANOVA-Fatorial. Sementes não germinadas (Imagem: GraphPadPrism 7).

5.2 Efeito do aquecimento, da elevação de CO₂ e da sua interação nos parâmetros de diversidade genética, endogamia e diferenciação genética em indivíduos da espécie *S. capitata*

Diversidade genética em progênies dos diferentes tratamentos. O teste ANOVA 2-Fatores evidenciou que não houve efeito significativo dos tratamentos nos parâmetros: número de alelos (A), número efetivo de alelos (Ae) e na heterozigosidade observada (Ho), conforme sumarizado na Tabela 7. Entretanto, houve efeito significativo do fator elevação de temperatura sobre o parâmetro heterozigosidade esperada ($***p < 0,001$, Tabela 7).

O número de alelos das progenies de todos os tratamentos foi similar, variando de $6,57 \pm 0,61$ no tratamento C, $6,43 \pm 0,80$ no tratamento eCO₂, $5,57 \pm 0,90$ em eT e $6,29$

$\pm 0,61$ em eCO_2+eT (Figura 21A). O número efetivo de alelos (Ae) também foi similar em todos os tratamentos, e sua média foi de $4,60 \pm 0,73$ no tratamento C, $3,91 \pm 0,63$ em eCO_2 , $2,99 \pm 0,57$ em eT e $3,43 \pm 0,50$ em eCO_2+eT (Figura 21B). A heterozigosidade observada também foi similar em todos os tratamentos analisados e variou de $0,30 \pm 0,12$ no tratamento C, em eCO_2 $0,35 \pm 0,13$, eT $0,28 \pm 0,12$ e eCO_2+eT $0,30 \pm 0,10$ (Figura 21C). Progênes oriundas dos tratamentos com eT apresentaram heterozigosidade esperada significativamente menor ($0,61 \pm 0,51$) que nos tratamentos controle ($0,76 \pm 0,02$), eCO_2 ($0,71 \pm 0,03$) e eCO_2+eT ($0,68 \pm 0,03$) (Figura 21D).

Tabela 7. Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros de diversidade genética analisados na população de progênes dos diferentes tratamentos. Médias seguidas do erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p : nível de significância, porcentagem de variação.

A (número de alelos)			
Fatores	Média \pm EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$6,57 \pm 0,61$	-	-
Elevado CO_2 (eCO_2)	$6,43 \pm 0,80$	$F = 0,15; p = 0,69$	0,25
Elevada Temperatura (eT)	$5,57 \pm 0,90$	$F = 0,59; p = 0,44$	0,97
Interação (eCO_2+eT)	$6,29 \pm 0,61$	$F = 0,34; p = 0,56$	0,55
Ae (número efetivo de alelos)			
Fatores	Média \pm EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$4,60 \pm 0,73$	-	-
Elevado CO_2 (eCO_2)	$3,91 \pm 0,63$	$F = 0,04; p = 0,84$	0,01
Elevada Temperatura (eT)	$2,99 \pm 0,57$	$F = 2,90; p = 0,09$	0,47
Interação (eCO_2+eT)	$3,43 \pm 0,50$	$F = 0,85; p = 0,36$	0,14
Ho (heterozigosidade observada)			
Fatores	Média \pm EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$0,30 \pm 0,12$	-	-
Elevado CO_2 (eCO_2)	$0,35 \pm 0,13$	$F = 0,09; p = 0,77$	0,01
Elevada Temperatura (eT)	$0,28 \pm 0,12$	$F = 0,09; p = 0,77$	0,01
Interação (eCO_2+eT)	$0,30 \pm 0,10$	$F = 0,02; p = 0,90$	0,02
He (heterozigosidade esperada)			
Fatores	Média \pm EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$0,76 \pm 0,02$	-	-
Elevado CO_2 (eCO_2)	$0,71 \pm 0,03$	$F = 0,08; p = 0,77$	0,14
Elevada Temperatura (eT)	$0,61 \pm 0,05$	$F = 6,76; p = 0,000^{***}$	1,09
Interação (eCO_2+eT)	$0,68 \pm 0,03$	$F = 3,00; p = 0,08$	0,48

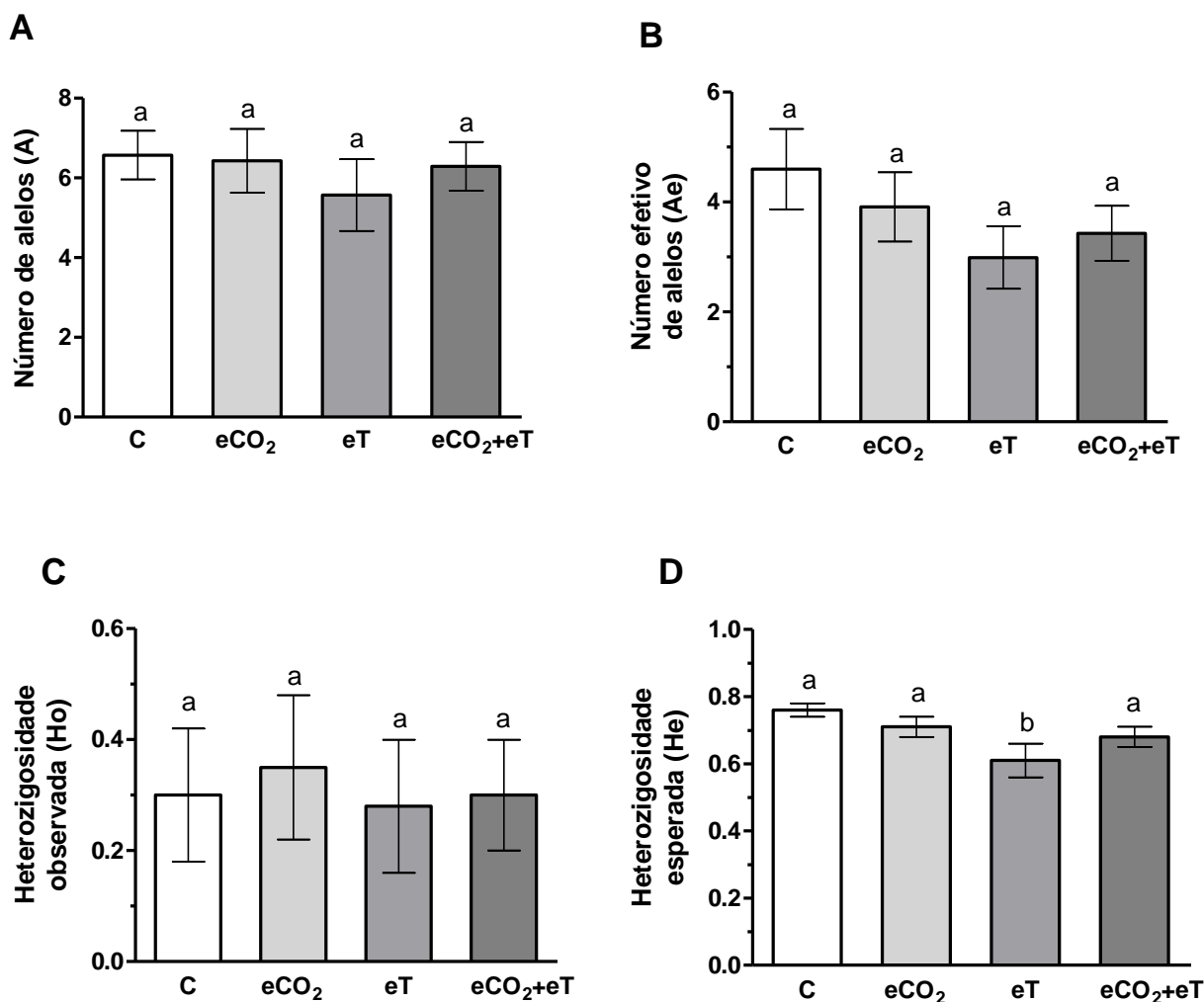


Figura 21. Parâmetros de diversidade genética das famílias provenientes dos diferentes grupos experimentais. A) Número de alelos, B) Número de alelos efetivo, C) Heterozigosidade observada, D) Heterozigosidade esperada nos diferentes grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($*p < 0,05$) entre os tratamentos após teste ANOVA-Fatorial. (Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism v.8.0).

Não houveram diferenças intergeracionais (matrizes vs progênies) em nenhum dos parâmetros de diversidade genética analisados (Tabela A1, em anexos), ou seja, após o evento reprodutivo, nenhum dos parâmetros de diversidade genética da população de progênies diferiu significativamente da população matriz.

Cabe ressaltar, que em ambas as populações (matrizes e progênies) de *S. capitata*, a heterozigosidade observada foi significativamente menor que a heterozigosidade esperada para quase todos os locus analisados (com exceção do locus E12) (vide Tabela A2, em anexo). Assim, neste grupo amostral existe maior proporção de homozigotos do que em uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Índices de fixação em progênes dos diferentes tratamentos. Não houve efeito significativo dos tratamentos no índice de fixação ($p > 0,05$, Tabela 9). Os valores médios de F_{IS} foram positivos em todos os grupos experimentais e estatisticamente similares entre si (Figura 22), variando de $0,62 \pm 0,13$ no tratamento Controle, a $0,54 \pm 0,13$ no eCO_2 , $0,57 \pm 0,15$ no tratamento eT e $0,58 \pm 0,11$ no eCO_2+eT . O valor médio de F_{IS} foi similar em matrizes $0,50 \pm 0,07$ e progênes $0,58 \pm 0,08$, sugerindo que, mesmo após um evento reprodutivo, a espécie manteve níveis de endogamia similares (Tabela A1, em anexo).

Tabela 8. Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para o índice de fixação na população de progênes. Médias seguidas do erro padrão, F: valor da estatística ANOVA, p : nível de significância, porcentagem de variação.

F_{IS}			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	$0,62 \pm 0,13$	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	$0,54 \pm 0,16$	F = 0,06; $p = 0,80$	0,01
Elevada Temperatura (eT)	$0,57 \pm 0,15$	F = 0,00; $p = 0,97$	0,00
Interação (eCO ₂ +eT)	$0,58 \pm 0,11$	F = 0,10; $p = 0,74$	0,02

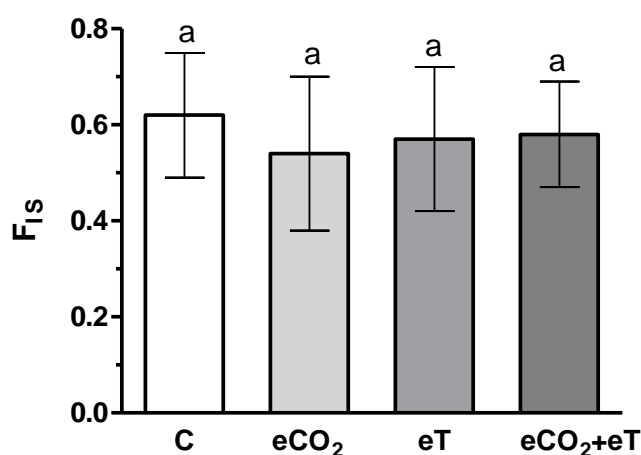


Figura 22. Médias e erro padrão do índice de fixação de progênes dos diferentes grupos experimentais. (Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism v.8.0).

Diferenciação genética nas populações de matrizes e progênes. A matriz de divergência genética, através do parâmetro F_{ST} , nas diferentes populações de matrizes e progênes é apresentada na Tabela 10. O teste exato de Fisher evidenciou diferenciação significativa entre as populações de progênes, nas médias de F_{ST} por tratamento. A

diferenciação na estrutura genética das progênies é baixa, porém significativa. (***) $p < 0,001$, Tabela 10). As progênies de parcelas aquecidas (eT) diferiram 8,70 % das progênies com a combinação (eCO₂+eT), 10,60 % do tratamento controle e 10,60 % do tratamento eCO₂. A população de progênies do tratamento C diferiu 4,50 % das progênies de eCO₂ e estas, por sua vez, diferiram 5,30 % das progênies derivadas do tratamento eT+eC (Tabela 9). As progênies eCO₂+eT diferiram 7,00 % das progênies derivadas no ambiente Controle.

Tabela 9. Matriz de divergência genética. Análise da estatística F_{ST} (Nei, 1973) entre populações de matrizes e progênies de *S. capitata* dos diferentes tratamentos (abaixo da diagonal). Legenda: (***) $p < 0,001$ após Teste Exato de Fisher.

	F_{ST} (matrizes)			F_{ST} (progênies)		
	C	eCO ₂	eT	C	eCO ₂	eT
C	-	-	-	-	-	-
eCO ₂	0,164 $p=0,95$	-	-	0,045*** $p < 0,001$	-	-
eT	0,293 $p=0,25$	0,280 $p=0,07$	-	0,106*** $p < 0,001$	0,108*** $p < 0,001$	-
eCO ₂ +eT	0,244 $p=0,73$	0,164 $p=0,87$	0,249 $p=0,24$	0,070*** $p < 0,001$	0,053*** $p < 0,001$	0,087*** $p < 0,001$

5.3 Efeito do aquecimento e da elevação de CO₂ e da sua interação nas taxas de cruzamento de famílias da espécie *S. capitata*

Todos os locus utilizados nesta pesquisa não estão ligados e segregam de forma independente, nem na população de matrizes, nem na de progênies (vide Tabela A3, em Anexos), cumprindo as premissas estabelecidas por Ritland e Jain (1981) para estimativa dos parâmetros de cruzamento.

O teste ANOVA 2-Fatores evidenciou que não houve efeito significativo dos tratamentos nos parâmetros taxa de cruzamento multiloco (tm), uniloco (ts), na taxa de cruzamento entre parentes (tm-ts) e na correlação de auto-fecundação (rt). Como mostrado na Tabela 11. As progênies dos diferentes tratamentos apresentaram taxas de fecundação cruzada (entre 0,47-0,61), corroborando que *S. capitata* possui um sistema de reprodução misto. Famílias do tratamento eT apresentaram taxa de cruzamento multiloco ligeiramente mais elevada (60,80%) que as famílias dos tratamentos C (48,90%), eCO₂ (54,40 %) e eCO₂+eT (47,20%), embora as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$, Figura 23A). O mesmo padrão foi observado na

taxa de cruzamento uniloco: maior valor foi observado nas famílias do tratamento eT (30,70%), seguido de eC (25,40%), eCO₂+eT (24,40%) e (21,80%) em C (Figura 23B). No tratamento controle, 27,00% dos acasalamentos ocorreu entre indivíduos relacionados (Tabela 11) e em 23,00% dos indivíduos do tratamento eCO₂+eT. Já nas famílias do tratamento com eT (30,10%) e com eCO₂ (29,00%) quase metade do total de fecundações cruzadas ocorreu entre indivíduos aparentados (Figura 23C).

Tabela 10. Sumário dos testes de ANOVA Fatorial para os parâmetros de taxas de cruzamento analisados nos diferentes tratamentos. F: valor da estatística ANOVA, *p*: nível de significância, porcentagem média de variação.

<i>tm (taxa de cruzamento multiloco)</i>			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	0,49 ± 0,06	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	0,54 ± 0,04	F = 0,37; <i>p</i> = 0,55	2,55
Elevada Temperatura (eT)	0,61 ± 0,09	F = 0,12; <i>p</i> = 0,73	0,83
Interação (eCO ₂ +eT)	0,47 ± 0,06	F = 2,02; <i>p</i> = 0,18	13,95
<i>ts (taxa de cruzamento uniloco)</i>			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	0,22 ± 0,04	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	0,25 ± 0,02	F = 0,10; <i>p</i> = 0,76	0,69
Elevada Temperatura (eT)	0,31 ± 0,07	F = 0,88; <i>p</i> = 0,37	6,15
Interação (eCO ₂ +eT)	0,24 ± 0,02	F = 1,30; <i>p</i> = 0,27	9,14
<i>tm-ts (taxa de cruzamento entre parentes)</i>			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	0,27 ± 0,07	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	0,29 ± 0,05	F = 0,24; <i>p</i> = 0,63	1,88
Elevada Temperatura (eT)	0,30 ± 0,03	F = 0,09; <i>p</i> = 0,77	0,69
Interação (eCO ₂ +eT)	0,23 ± 0,06	F = 0,69; <i>p</i> = 0,42	5,27
<i>rs (correlação de autofecundação)</i>			
Fatores	Média ± EP	Valor de F-ANOVA	% de variação
Controle (C)	0,20 ± 0,12	-	-
Elevado CO ₂ (eCO ₂)	0,43 ± 0,15	F = 2,55; <i>p</i> = 0,13	15,76
Elevada Temperatura (eT)	0,39 ± 0,07	F = 1,61; <i>p</i> = 0,23	9,91
Interação (eCO ₂ +eT)	0,55 ± 0,13	F = 0,05; <i>p</i> = 0,82	0,32

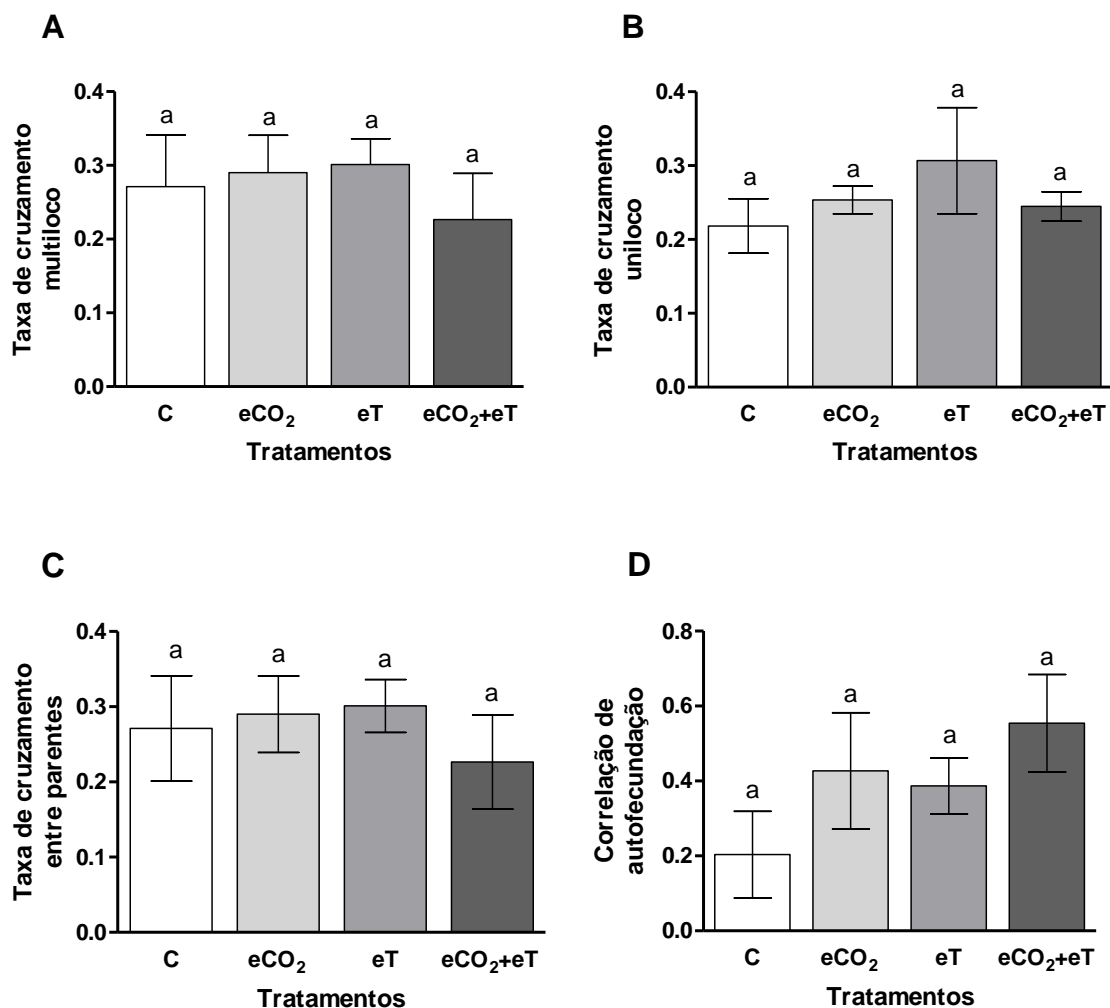


Figura 23. Dados de média e erro padrão em gráfico de barras, por tratamento. A) Taxa de cruzamento multiloco, B) Taxa de cruzamento uniloco, C) Taxa de cruzamento entre parentes, D) Correlação de autofecundação (Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism v.8.0).

A correlação de auto-fecundação (r_s) indica se houve variação na taxa de cruzamento observada, que variou entre 20,00% (Controle) e 55,40% (eC+eT) (Figura 23D).

Os dados de correlação de paternidade multilocus foram altos (com exceção de algumas repetições), indicando que muitas das progênies compartilharam os mesmos genitores (feminino e masculino), ou seja, são irmãos completos (Tabela 12). As famílias do tratamento eCO₂+eT foram as que demonstraram ter menor parentesco entre si (Tabela 12).

Tabela 11. Demais parâmetros de sistema de cruzamento de progênies de *S. capitata*, separados em cada uma das quatro repetições. Médias seguidas do erro padrão.

Tratamentos / Repetições		<i>Correlação multiloco de paternidade: $r_{p(m)}$</i>	<i>Correlação uniloco de paternidade: $r_{p(s)}$</i>	<i>Parentesco entre doadores de pólen: $r_{p(s)} - r_{p(m)}$</i>
Controle	1	0,80 ± 0,38	0,42 ± 0,41	0,13 ± 0,15
	2	0,85 ± 0,35	0,99 ± 0,43	0,24 ± 0,18
	3	0,92 ± 0,56	0,50 ± 0,34	0,29 ± 0,24
	4	0,28 ± 0,24	0,86 ± 0,53	0,99 ± 0,59
eC	1	0,99 ± 0,36	0,99 ± 0,42	-0,20 ± 0,24
	2	0,30 ± 0,21	-0,20 ± 0,02	-0,20 ± 0,25
	3	0,86 ± 0,40	0,74 ± 0,47	0,27 ± 0,22
	4	0,67 ± 0,43	0,65 ± 0,42	-0,20 ± 0,06
eT	1	0,61 ± 0,31	-0,38 ± 0,18	-0,48 ± 0,25
	2	0,75 ± 0,32	0,15 ± 0,17	-0,51 ± 0,16
	3	0,75 ± 0,46	-0,42 ± 0,21	-0,46 ± 0,22
	4	0,99 ± 0,58	0,58 ± 0,29	0,00 ± 0,02
eT+eC	1	-0,00 ± 0,22	0,00 ± 0,21	-0,20 ± 0,11
	2	0,70 ± 0,29	-0,50 ± 0,22	-0,90 ± 0,39
	3	0,19 ± 0,18	-0,11 ± 0,18	0,08 ± 0,04
	4	0,03 ± 0,11	-0,02 ± 0,01	-0,23 ± 0,10

A Tabela 13 apresenta alguns parâmetros do sistema de cruzamento por família. Verificamos que em todos os tratamentos existem famílias com elevadas taxas de cruzamento multi e uniloco. Enquanto que também existem famílias com baixos valores para estes parâmetros. Assim, esses dados servem para entendermos que, ao analisarmos a diferença entre as médias, devemos levar em conta o desempenho de cada família.

Tabela 12. Estimativa de parâmetros de taxas de cruzamento de *S. capitata* avaliadas nas progênies dos diferentes tratamentos. Erro padrão da média entre parênteses, obtido após 1000 reamostragens bootstraps pelo programa MLTR.

Tratamento (famílias)	Família	Taxa de cruzamento multiloco: t_m	Taxa de cruzamento uniloco: t_s	Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	Correlação de autofecundação: r_s
Controle	2.11	0,87 (0,44)	0,27 (0,15)	0,61 (0,29)	-0,20 (0,06)
	2.12	0,12 (0,09)	0,03 (0,03)	0,09 (0,07)	-0,07 (0,13)
	2.13	0,63 (0,33)	0,21 (0,14)	0,42 (0,20)	0,44 (0,12)
	4.10	0,56 (0,28)	0,22 (0,12)	0,34 (0,17)	0,22 (0,08)
	4.11	0,25 (0,15)	0,05 (0,03)	0,20 (0,11)	-0,06 (0,05)
	4.13	0,37 (0,20)	0,10 (0,06)	0,28 (0,15)	-0,04 (0,03)
	9.10	0,69 (0,35)	0,18 (0,11)	0,51 (0,25)	0,06 (0,06)
	9.12	0,56 (0,28)	0,19 (0,11)	0,37 (0,18)	0,02 (0,02)
	12.2	0,50 (0,25)	0,26 (0,14)	0,24 (0,12)	-0,01 (0,02)
	12.13	0,25 (0,15)	0,08 (0,05)	0,17 (0,10)	-0,02 (0,04)
eC	1.10	0,938 (0,489)	0,31 (0,17)	0,63 (0,33)	0,80 (0,19)
	1.11	0,563 (0,282)	0,17 (0,11)	0,39 (0,19)	0,09 (0,04)
	1.12	0,500 (0,258)	0,15 (0,08)	0,35 (0,18)	-0,03 (0,03)
	3.2	0,942 (0,495)	0,40 (0,22)	0,54 (0,29)	0,63 (0,17)
	3.8	0,125 (0,090)	0,04 (0,03)	0,08 (0,06)	-0,05 (0,13)
	10.15	0,938 (0,501)	0,34 (0,19)	0,60 (0,32)	-0,02 (0,06)
	10.10	0,125 (0,089)	0,03 (0,02)	0,10 (0,07)	-0,07 (0,12)
	10.11	0,438 (0,232)	0,14 (0,08)	0,30 (0,15)	0,09 (0,05)
	11.1	0,377 (0,204)	0,14 (0,08)	0,24 (0,13)	0,47 (0,13)
	11.11	0,500 (0,261)	0,20 (0,11)	0,31 (0,15)	-0,02 (0,03)
eT	5.2	0,938 (0,44)	0,36 (0,19)	0,57 (0,26)	-0,89 (0,42)
	5.3	0,188 (0,09)	0,05 (0,02)	0,14 (0,06)	-0,06 (0,03)
	5.12	0,125 (0,06)	0,04 (0,02)	0,08 (0,04)	-0,06 (0,03)
	8.3	0,252 (0,12)	0,07 (0,04)	0,18 (0,08)	0,20 (0,10)
	8.10	0,501 (0,24)	0,29 (0,15)	0,21 (0,10)	0,04 (0,03)
	8.12	0,694 (0,33)	0,27 (0,14)	0,42 (0,20)	0,94 (0,46)
	15.3	1,200 (0,58)	0,35 (0,20)	0,85 (0,40)	-0,99 (0,48)
	15.10	0,626 (0,30)	0,29 (0,15)	0,34 (0,16)	-0,03 (0,02)
	13.2	0,455 (0,22)	0,18 (0,10)	0,27 (0,13)	0,23 (0,12)
	13.13	0,875 (0,41)	0,33 (0,17)	0,55 (0,25)	-0,86 (0,40)
eT+eC	6.1	0,06 (0,06)	0,03 (0,03)	0,03 (0,03)	-0,20 (0,17)
	6.10	0,75 (0,36)	0,41 (0,23)	0,34 (0,16)	-0,05 (0,04)
	6.11	0,06 (0,05)	0,02 (0,02)	0,05 (0,04)	-0,20 (0,17)
	7.1	0,31 (0,17)	0,07 (0,04)	0,24 (0,13)	0,04 (0,03)
	7.11	0,81 (0,41)	0,28 (0,17)	0,53 (0,25)	-0,05 (0,05)
	7.12	0,53 (0,28)	0,16 (0,10)	0,37 (0,19)	0,06 (0,03)
	14.4	1,20 (0,58)	0,43 (0,26)	0,77 (0,35)	-0,20 (0,06)
	14.8	0,12 (0,09)	0,03 (0,03)	0,09 (0,07)	-0,06 (0,10)
	16.2	0,88 (0,43)	0,32 (0,19)	0,55 (0,27)	-0,20 (0,05)
	16.10	0,06 (0,06)	0,02 (0,02)	0,04 (0,04)	-0,20 (0,20)

6. DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa são inéditos e de grande contribuição para o entendimento da performance de alguns parâmetros biológicos e genéticos da espécie leguminosa tropical *S. capitata*, frente a simulação de um cenário de mudanças climáticas futuras como aquecimento e elevação de CO₂ e suas interações.

A capacidade de modular-se ao ambiente (plasticidade fenotípica) é uma das principais vantagens evolutivas do reino vegetal (Lovett-Doust e Lovett-Doust, 1988). Como organismos sésseis, as plantas estão sujeitas a diversas variações de fatores ambientais, que podem afetar os processos fundamentais no seu ciclo de vida, tais como a germinação, floração e fertilização (Wheeler e Reynolds, 2013). As plantas cultivadas são especialmente vulneráveis neste período, uma vez que ele representa, na maioria dos casos, seu valor agro-econômico (Hedhly, 2011).

Os resultados confirmam parte da hipótese relacionada aos efeitos significativos dos tratamentos sobre os parâmetros morfo-fisiológicos na espécie *S. capitata*. Plantas crescidas em ambientes aquecidos em +2°C (eT) e na interação do aquecimento com elevação de CO₂ (eCO₂+eT) apresentaram um maior número de sementes por inflorescência, maior proporção de sementes com coloração bege rajada e menor proporção de sementes marrom lisa. Também foi observado que, sementes provenientes do tratamento eT tiveram menor proporção de sementes inviáveis. Grande parte do investimento energético de uma planta em sua fase reprodutiva é direcionada para a produção de gametas e conseqüentemente para a produção de sementes (Porcher e Lande, 2005). Sabe-se que o aumento no “esforço reprodutivo”, ou seja, no número de flores e na massa de florescimento é uma das adaptações observadas frente ao aquecimento em diversas espécies vegetais (Schauber et al., 2002; Hegland et al., 2009). O aumento na produção de flores durante alguns dias do ciclo reprodutivo de *S. capitata* foi observado em campo, neste experimento, tal como documentado por Alzate-Marin et al. (2017), especialmente nos tratamentos com elevação de temperatura (eT) e com ambos (eCO₂+eT), tendo como consequência, portanto, o favorecimento de maior produção de sementes viáveis.

Porém, quando o número de óvulos fecundados é maior do que as plantas são capazes de maturar, a compensação desse excesso pode ser dado por um aumento nas taxas de aborto (Porcher e Lande, 2005). Culturas de leguminosas costumam ser sensíveis ao estresse térmico, sendo comum os relatos de perdas no rendimento devido

ao aborto de flores e vagens (Siddique et al., 1999). Em ervilha (*Pisum sativum*) as taxas de aborto foram maiores em plantas expostas ao aquecimento (Jiang, 2016). Entretanto, nossos resultados as proporções de aborto foram similares entre 5,6% (eT) a 9,75% (Controle). Por se tratar de uma espécie leguminosa forrageira tropical, híbrida e altamente resistente a condições de calor e seca, os resultados de baixa taxa de abortos era esperada, conforme nossa hipótese inicial, por ser uma estratégia natural da espécie, que possibilita realocar os recursos para assegurar a viabilidade de parte da progênie (Ghazoul e Satake, 2009).

Com relação à germinação e velocidade de germinação das sementes, os resultados mostram que não houve efeito significativo do aquecimento e elevação de CO₂ e suas interações sobre a germinabilidade e velocidade de germinação das sementes de *S. capitata*, confirmando a hipótese proposta. Estes resultados podem ser devidos a que a espécie estudada é nativa da flora Brasileira e ocorre em regiões biogeográficas tropicais, adaptada a diferentes ambientes (Costa e Schultze-Kraft, 1990, Figura 2). A germinação das sementes constitui um dos processos mais críticos dentro o ciclo de vida das plantas e pode ser definida como o crescimento inicial do embrião após um período de dormência, onde o seu metabolismo encontrava-se inativo (Ferreira e Borghetti, 2004). A capacidade de desenvolvimento do embrião (germinação e velocidade da germinação) e o estabelecimento das plântulas (vigor) no habitat são entendidos como outros importantes fatores que influenciam a dinâmica das populações vegetais (Marty e Bassirirad, 2014).

Três das principais características que afetam a capacidade de germinação das sementes estão sobre herança materna, sendo eles: o tegumento da semente, conteúdo do endosperma e a formação embrião (Donohue, 2009). O tegumento das sementes é a estrutura responsável por interligar os processos do ambiente interno com o ambiente externo sendo um dos principais determinantes dos potenciais de germinação (através de modificações na permeabilidade à água e ao oxigênio), vigor e longevidade das sementes (Souza e Marcos-Filho, 2001; Voegele et al., 2012). Argel e Humphreys (1983) observaram que em *Stylosanthes hamata* cv. Verano uma mudança na temperatura na formação das sementes (de 27°C para 21°C) resultou em uma alteração na coloração das sementes de escura para clara. Nesta pesquisa foi observado que os tratamento com elevação de temperatura (eT) e sua interação (eCO₂+eT) apresentaram maior proporção de sementes de cor bege rugosa. A cor do tegumento é uma das

características do revestimento de sementes associada à absorção de água, sendo que as sementes pigmentadas apresentam mais baixa embebição, ainda que estas características possam ser espécie-específicas (Souza e Marcos-Filho 2001; Mavi, 2010).

Neste experimento não foi observada uma diferença de germinabilidade nos tratamentos aquecidos, possivelmente devido ao tempo de armazenamento das sementes usadas para o experimento (18 meses). Sementes de *S. capitata* são bem tolerantes ao tempo de armazenamento, assim o armazenamento por aproximadamente de 12 meses contribui também para a perda de dormência da espécie (Américo, 2015; Silva, 2019), faltaria elucidar o papel da cor de tegumento destas sementes na sobrevivência da espécie. Erasmus e Pieterse (2001) trabalhando com *Stylosanthes guianensis* observaram maior porcentagem de germinação de sementes de cor clara com relação às escuras, sem aplicação de nenhum tratamento. Assim a mistura de ambas as colorações de sementes em condições naturais desempenharia um papel importante no desenvolvimento e sobrevivência dessa espécie. Desta forma, estes resultados mostram que estas progênes podem carregar os efeitos ambientais maternos para a próxima geração, que possivelmente conferirão maior adaptabilidade a ambientes mais quentes (Wulff et al., 1994; Marty e BassiriRad, 2014).

As respostas à temperatura diferem entre as espécies ao longo do seu ciclo de vida. *Stylosanthes capitata* é uma planta de ciclo curto, cuja parte vegetativa pode se regenerar por até três anos, mas a manutenção de sua população é assegurada por dispersão de sementes (Fairey et al., 1997). Para cada espécie, existe um intervalo de temperaturas mínimas e máximas, que formam os limites do crescimento ótimo, onde o desenvolvimento vegetativo aumenta a medida que a temperatura se aproxima do nível ideal da espécie (Hatfield e Pruger, 2015). De acordo com nossos resultados, aparentemente o aumento de 2°C (eT) e suas interações com CO₂ (eT+eCO₂) foi benéfico para a produção de sementes, e para alguns outros parâmetros morfo-fisiológicos de *S. capitata* como já discutido, ou seja é possível que esse aumento esteja no intervalo de temperaturas mínimas e máximas da espécie, uma vez que esta espécie ocorre naturalmente em regiões de cerrado, caatinga e mata seca tropicais (Costa e Schutze-Kraft, 1990, Figura 2).

Por outro lado, não observamos diferenças entre o grupo tratado com eCO₂ e o grupo controle em nenhum dos parâmetros avaliados nesta pesquisa, embora sim observamos respostas em alguns parâmetro morfo-fisiológicos quando em interação

com a temperatura. Com relação à germinabilidade e a velocidade de germinação não existe um consenso acerca do efeito do incremento de CO₂ no ambiente materno, pois as respostas variaram de acordo com os grupos funcionais e espécies vegetais (Jablonski et al, 2002; Marty e Bassirrad, 2014). Os efeitos do aumento CO₂ nos sistemas vegetais são conhecidos principalmente por estudos experimentais em pequena escala, o que dificulta o estabelecimento de um consenso do comportamento futuro do ciclo do carbono a nível global, já que é muito ampla a gama de respostas dos diferentes grupos vegetais frente à elevação de CO₂ (Booth et al., 2012).

Alterações morfológicas e estruturais nas sementes podem ocorrer frente a condições ambientais adversas e podem ser consideradas como uma pressão seletiva para promover a adaptação da população à situação ambiental estressora (Gutterman 2000; Gratani, 2014). As mudanças climáticas, a deposição de compostos tóxicos e mudanças no uso da terra são apontadas como as principais causas da perda de diversidade genética dos ecossistemas vegetais, afetando por consequência a composição das comunidades, as interações entre espécies, a estrutura e dinâmica dos ecossistemas (Henry, 2005). Neste cenário, as mudanças climáticas parecem ser uma causa adicional à perda de diversidade em populações vegetais, ameaçando muitas espécies nativas (Jarvis et al., 2008).

Contrário à nossa hipótese inicial, os tratamentos com elevação de temperatura (+2°C), com elevação de CO₂ (600ppm) e suas interações no ambiente parental não exerceram efeito significativo sobre a maioria dos parâmetros de diversidade genética analisados (número total de alelos, número de alelos efetivos, a heterozigosidade observada e índice de fixação). Os índices de fixação também foram altos e similares nas progênies de todos os tratamentos e (Média progênies: 0.58 ± 0.06), assim como similares entre as duas gerações (Média matrizes: 0.50 ± 0.07). Nossos resultados evidenciam uma redução significativa no valor da diversidade (He) e maiores distâncias genéticas da prole derivadas do tratamento com eT quando comparadas com os outros tratamentos. A redução da heterozigosidade esperada indica um aumento na frequência genotípica de homozigotos na população eT. A diversidade genética das plantas está diretamente relacionada ao sistema de acasalamento das espécies, uma vez que é a principal causa de variação genética dentro das populações (Henry 2005).

As populações dos diferentes tratamentos divergiram entre si. Os índices F_{ST} observados nas diferentes populações foram baixos, indicando que grande parte da

variabilidade genética observada estava dentro das populações. Mas que, uma pequena parte desta variabilidade (de 4,5% a 10,8%), deve-se a diferenças no evento reprodutivo (uma vez em sua totalidade encontra-se dentro das populações. Os valores de divergência entre populações (F_{st}) encontrados foram comparáveis aos relatados por Hamrick e Godt (1996) os quais são esperados para as espécies endêmicas de cruzamento misto. Assim, possivelmente pelo fluxo de abelhas entre estes dois tratamentos, uma vez que, a abertura floral destas parcelas ocorria cerca de uma hora antes da abertura floral nos demais tratamentos (Alzate-marin et al., 2017). Galashi-Teixeira e colaboradores (2015) evidenciou abelhas do gênero *Apis mellifera* como um dos principais polinizadoras de *S. capitata* neste modelo experimental no ano de 2015. Sabe-se que abelhas que habitam próximas a cultivos tendem visitar aquele mesmo local até que os recursos florais se esgotem (Free, 1993). Assim, esse comportamento favorece a estruturação dos genótipos. A determinação da estrutura genética de populações tem implicações nas estratégias de melhoramento e conservação das espécies (Laurentín, 2009).

O entendimento do sistema de reprodução é fundamental para manutenção da variabilidade genética intrapopulacional (Brown et al., 1990; Henry, 2005), determinando o modo de transmissão de genes e a composição genética da descendência, e conseqüentemente, o *pool* genético disponível para seleção natural. Os resultados desta pesquisa corroboram o observado na literatura para *S. capitata*, como uma espécie com sistema de reprodução misto, com alta frequência de autopolinização, tal como relatado na literatura (Miles, 1983, Chiari et al., 2007, Santos-Garcia et al., 2011), mostrando que nossos dados são consistentes.

As alterações no ambiente não afetaram significativamente o evento reprodutivo do ano de 2015, estudado sob condições de simulação em condições de campo no Trop-T-Face (USP/Ribeirão Preto, SP). Mas apesar da diferença observada não ser estatisticamente significativa, nossos dados evidenciam que nos tratamentos eT e eC houveram maiores valores absolutos de polinização cruzada ($tm_{eT} = 60,8\%$ e $tm_{eC} = 54,4\%$), em relação aos outros tratamentos (C, $tm_C = 47\%$ e $tm_{eC+eT} = 49\%$). As taxas de cruzamento multiloco, variando de 47,1% a 60,8% nos diferentes tratamentos, estão de acordo a prévios relatos, já que espécies do gênero *Stylosanthes* polinizadas por animais costumam apresentar taxas de cruzamento entre 20 e 80%, dependendo da presença e atividade dos polinizadores (Santos-Garcia et al, 2010; Vogler e Kalisz 2001). Mesmo

com as alterações fenológicas observadas em campo nos tratamentos aquecidos (aumento no número de flores, no período de abertura floral e na taxa de visitação dos polinizadores) (Alzate-Marin et al., 2017), as taxas de cruzamento multi e uniloco de *S. capitata* se mantiveram similares a dos demais grupos experimentais, refutando a hipótese inicial.

De acordo a Turchetto et al. (2015), estimativas relativamente altas de tm-ts e valores negativos de rps-rpm são influenciados por cruzamentos consanguíneos, como também observado nas nossas análises. Sabe-se que temperaturas elevadas afetam a fisiologia das plantas com flores de várias maneiras, resultando na produção alterada de flores, néctar e pólen (Petanidou e Smets, 1996; Saavedra et al., 2003; Scaven e Rafferty, 2013).

Cada evento reprodutivo é único, e influenciado por uma gama de fatores, sejam eles morfológicos (estrutura da flor, disposição dos estames, presença ou ausência de sistemas de auto-incompatibilidade), fisiológicos (fertilidade, número de óvulos, pólen e sementes), fenológicos (tempo de florescimento, abundância de flores) e ecológicos (comportamento dos polinizadores, variação na disponibilidade e atividade dos mesmos) (Saavedra et al., 2003; Kameyama e Kudo, 2009). A disponibilidade alimentar governa a atividade e a densidade populacional dos polinizadores, assim, o aumento no recurso alimentar pode causar alterações na comunidade de polinizadores e no comportamento dos polinizadores (Steffan-Dewenter e Schiele, 2008). Desta forma, um dos fatores responsáveis pela manutenção da diversidade genética e das taxas de cruzamento desta espécie forrageira, são as polinizações proporcionadas por agentes bióticos, como as abelhas.

Embora o papel dos visitantes florais na prestação de serviços de polinização e na produtividade agrícola seja reconhecido há milênios, ainda assim, as populações de abelhas tem sofrido intensas ameaças em virtude das mudanças ambientais e climáticas. Neste contexto, a conservação de cultivos de espécies de importância econômica (como *S. capitata*) está intimamente relacionada à conservação de seus polinizadores. Medidas de conservação da biodiversidade e de conscientização, associadas e fontes de obtenção e melhora da produtividade agropecuária pode ser um caminho de sucesso para reconstrução de modelos mais sustentáveis para a utilização e consumo dos recursos naturais (Rosenzweig et al, 2008; Tilio Neto, 2010). Por isso, estratégias de intensificação da produção sustentável de alimentos devem ser foco de pesquisas e

aplicações, como importantes alternativas para melhorar o uso da terra, promover a conservação da biodiversidade e o bem-estar animal e assegurar a manutenção da nutrição humana (Godfrey e Garnet, 2014).

Assim, sugere-se a utilização de estratégias e práticas agrícolas “amigáveis” aos polinizadores, nos cultivos de *S. capitata*. Estas práticas benéficas para os polinizadores assegurariam também a diversidade genética da espécie e possibilitariam a manutenção da qualidade e vigor desta leguminosa utilizada como pastagem. Dentre essas possíveis estratégias podemos destacar: proximidade de cultivos a fragmentos florestais, redução no uso de agrotóxicos, associação com outras espécies de plantas visitadas por abelhas e, também, manejo de caixas racionais de abelhas próximas às culturas (Gordo e Sanz, 2006).

S. capitata além de ser uma importante fonte de forragem nutritiva para o gado, também é promissora para recuperação de solos pobres e degradados (Grof et al., 1979; Grof et al., 2005). Assim, também seria possível aliar as duas importantes funções de esta espécie: a ecológica e a econômica, já que os dados sugerem uma aparente resiliência a um dos possíveis cenários das mudanças climáticas. Dados de modelagem de nosso grupo de pesquisa (não publicados) demonstram que *S. capitata* possivelmente ampliará seu nicho ecológico nos próximos 50 anos, em cenários de aumento de temperatura. Dada a crescente demanda da pecuária no mercado internacional de carne, a utilização de *S. capitata* pode ser uma espécie aliada da indústria agropecuária, pois viabilizaria a produtividade e nutrição do gado.

Determinar a diversidade e taxas de cruzamento de espécies aloploplóides é fundamental para prever seu destino em longo prazo, principalmente porque as mudanças climáticas globais estão continuamente alterando os ambientes, apresentando novos desafios à sua sobrevivência (Vallejo-Marín e Hiscock, 2016). Hibridização e poliploidia há longa-data são apontadas como mecanismos evolutivos que conferem ao táxon mais resiliência para sobreviver em habitats mais diversos (Willis e Elwain, 2004). Os dados de *S. capitata* (alo-tetraploide) aqui apresentados estão de acordo com os pressupostos da literatura e evidenciam uma vantagem dessa espécie para adaptação e resistência às condições de elevação de temperatura e de CO₂ e suas interações.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa apresenta as respostas da espécie *Stylosanthes capitata* (Vogel) frente a uma simulação de mudanças climáticas futuras, realizadas em um sistema denominado *Temperature free air controlled enhancement e Free-air carbon dioxide enrichment* (Trop-T-FACE) instalado no campus da USP de Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Os dados sugerem que a elevação da temperatura (+2°C) sozinha e combinada com a elevação de CO₂ (600 ppm) no ambiente parental é capaz de induzir mudanças no desenvolvimento vegetativo de *S. capitata*, não só aumentando o número de sementes produzidas (possivelmente como consequência do maior número de flores produzidas nestes tratamentos), mas também promovendo alterações na coloração do tegumento das sementes e melhorando qualidade das plântulas germinadas. As alterações morfo-fisiológicas apresentadas nestes resultados sugerem a ocorrência de mecanismos de adaptação da espécie *Stylosanthes capitata* (Vogel) frente a cenários futuros de aquecimento climático (+2 °C), nas condições experimentais realizadas.

Os dados de diversidade genética e taxas de cruzamento não foram influenciados pelo tratamento parental, os quais são resultado tanto de mudanças fenológicas da planta como resposta aos tratamentos (antecipação da abertura floral em aproximadamente uma hora nos tratamentos eT e eT+eCO₂ e aumento da floração) (Alzate-Marin et al., 2017), assim como de mudanças comportamentais nos polinizadores naturais como resposta a este estímulo, como aumento da sua visitação (Teixeira et al., 2015). No entanto as condições climáticas das colmeias ou ninhos destes insetos não foram controladas (o que era inviável nas condições experimentais propostas).

Assim, os resultados aqui apresentados só foram positivos e sugerem uma resiliência e adaptação desta espécie, graças a abundância atual de polinizadores, o que poderia ser diferente se mudanças climáticas futuras também afectassem a sobrevivência destes polinizadores. Assim, esta pesquisa apresenta resultados inéditos da espécie nativa tropical *Stylosanthes capitata* (Vogel) ante cenários de mudanças climáticas futuras (aquecimento atmosférico [+2 °C] e elevação de CO₂ [600 ppm]) que mostram a resiliência da espécie em alguns parâmetros biológicos e genéticos ligados a reprodução os quais são fundamentais para sua sobrevivência e adaptação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.M.; HURD, B.H.; LENHART, S.; LEARY, N. Effects of global climate change on agriculture: an interpretative review. **Climate research**, v. 11, n. 1, p. 19-30, 1998.

AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular ecology**, v. 17, n. 24, p. 5177-5188, 2008.

AINSWORTH, E.A.; LONG, S.P. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. **New phytologist**, v. 165, n. 2, p. 351-372, 2005.

ALENCAR, K.D.C.; LAURA, V.A.; RODRIGUES, A.P.D.C.; RESENDE, R.M.S. (2009). Tratamento térmico para superação da dormência em sementes de *Stylosanthes* SW (Fabaceae Papilionoideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 164-170, 2009.

ALEXANDER, H. M.; WULFF, R. D. Experimental ecological genetics in *Plantago*: X. The effects of maternal temperature on seed and seedling characters in *P. lanceolata*. **The Journal of Ecology**, p. 271-282, 1985.

ALLEN, L. H.; BAKER, J.; BOOTE, K.J. **The CO₂ fertilization effect: higher carbohydrate production and retention as biomass and seed yield**. In: Global climate change and agricultural production. Direct and indirect effects of changing hydrological, pedological and plant physiological processes. FAO, Roma (Italia), 1996. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/w5183e/w5183e00.htm#Contents>> Acesso em: Setembro de 2019.

ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F.M.; HECKLER, J.C.; MACEDO, R.A.T.; BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.C.P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 449-456, 2006.

ALZATE-MARIN, A.L.; GALASCHI-TEIXEIRA, J.; ANACLETO-BONIFÁCIO, F. et al. **Increasing warming and CO₂ leads changes in floral number, floral opening/closure and floral visitor/pollinator frequency in forage *Stylosanthes capitata* Vogel (Fabaceae)** - em preparação, 2019.

ALZATE-MARIN, A.L.; GUIDUGLI, M.C.; SORIANI, H.H.; MARTINEZ, C.A. (2009). An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1217-1224, 2009.

ALZATE-MARIN, A.L.; SILVA, C. C. ; GALASCHI-TEIXEIRA, J. S. ; RIVAS, P. M. S. ; Bonifácio-Anacleto, F. ; GAROFALO, C. A. ; MARTINEZ, C. A. . Effect of warming and elevated CO₂ in flowering number, insect visitation and speed of germination of leguminous forage *Stylosanthes capitata* (Vogel) in a Trop-T-FACE

system. In: **2nd Agriculture and Climate Change Conference: Climate ready resource use-efficient crops to sustain food and nutritional security**. Sitges, Barcelona (Espanha), 2017. p. P2.036.

AMÉRICO, F.K.D.A. **Germinação e armazenamento de sementes de *Stylosanthes Sw.* em diferentes ambientes**. 60p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

ANDRADE, C. M. S.; DE ASSIS, G. M. L.; SALES, M. F. L. **Estilosantes Campo Grande: leguminosa forrageira recomendada para solos arenosos do Acre**. Embrapa Acre-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/879062/1/Circulartec.55.pdf>> Acesso: Setembro de 2019.

ANDRADE, C.D.; GARCIA, R.; COUTO, L.; PEREIRA, O. G.; SOUZA, A. D. Desempenho de seis gramíneas solteiras ou consorciadas com o *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e eucalipto em sistema silvipastoril. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1845-1850, 2003.

ANDRADE, R.P. Pasture seed production technology in Brazil. In: **International Grassland Congress**. 2001. p. 129-132. Disponível em: <<https://www.internationalgrasslands.org/files/igc/publications/2001/tema3-2.pdf>> Acesso: Setembro de 2019.

ARGEL, P. J.; HUMPHREYS, L. R. Environmental effects on seed development and hardseededness in *Stylosanthes hamata* cv. Verano. I. Temperature. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 34, n. 3, p. 261-270, 1983.

BARCELLOS, A.D.O., RAMOS, A.K.B., VILELA, L.; JUNIOR, M.; BUENO, G. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. SPE, p. 51-67, 2008.

BARRETT, S. C. H.; HARDER, L.D. Ecology and evolution of plant mating. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 2, p. 73-79, 1996.

BARROS, D. F.; ALBERNAZ, A. L. M. Possible impacts of climate change on wetlands and its biota in the Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 810-820, 2014.

BENISTON, M.; STEPHENSON, D. Extreme climatic events and their evolution under changing climatic conditions. **Global and planetary change**, v. 44, n. 1-4, p. 1-9, 2004.

BISHOP, K.A.; LEAKEY, A.D.B.; AINSWORTH, E.A. How seasonal temperature or water inputs affect the relative response of C3 crops to elevated [CO₂]: a global analysis of open top chamber and free air CO₂ enrichment studies. **Food and Energy Security**, v. 3, n. 1, p. 33-45, 2014.

BOOTE, K.J.; ALLEN, L.H.J.; PRASAD, P.V.; BAKER, J.T.; GESCH, R.W.; SNYDER, A.M, et al. (2005). Elevated temperature and CO₂ impacts on pollination,

reproductive growth, and yield of several globally important crops. **Journal of Agricultural Meteorology**, v. 60, n. 5, p. 469-474, 2005.

BOOTH, B.B.; JONES, C.D.; COLLINS, M.; TOTTERDELL, I.J.; COX, P.M.; SITCH, S. et al. High sensitivity of future global warming to land carbon cycle processes. **Environmental Research Letters**, v. 7, n. 2, p. 024002, 2012.

BRANDÃO, M. B.; COSTA, N. M. S. **O gênero *Stylosanthes* Swartz no Brasil**. Epamig, Minas Gerais, 107p, 1979.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399 p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise_sementes.pdf Acesso em: Setembro de 2019.

BRAY, R.A.; HUTTON, E.M. **Plant breeding and genetics**. In: Eds N.H. Shaw; W.W. Bryan, editor/s. *Tropical Pasture Research - Principles and Methods*. Farnham Royal, UK, 1976.

BROWN, A. H. D. et al. **Genetic characterization of plant mating systems**. Plant population genetics, breeding, and genetic resources., p. 145-162, 1990.

CALLES, T.; SCHULTZE-KRAFT, R. New species, nomenclatural changes and recent taxonomic studies in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae): An update. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 4, n. 2, p. 122-128, 2016.

CARDOSO, A. S.; BERNDT, A.; LEYTEM, A.; ALVES, B.J.; CARVALHO, I.D.N., BARROS-SOARES, L.H. et al. Impact of the intensification of beef production in Brazil on greenhouse gas emissions and land use. *Agricultural Systems*, v. 143, p. 86-96, 2016.

CHIARI, L.; RESENDE, R.M.S.; MATIDA, E.; ROBLES, C.S. Estimativa da taxa de cruzamento em *Stylosanthes capitata* usando marcadores RAPD. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, São Lourenço, MG. Lavras: UFLA, 2007.

CHIARI, L.; RESENDE, R.M.S.; MATIDA, E.T. Short Communication Mating system parameters in *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. based on RAPD markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 36, 2010.

CORADIN, L., E SCHULTZE-KRAFT, R. Germplasm collection of tropical pasture legumes in Brazil. **Tropical agriculture**, v. 67, n. 2, p. 98-100, 1990.

COSTA, L.C.; SARTORI, A.L.B.; POTT, A. Estudo taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, n. 3, p. 547-572, 2008.

COSTA, L.C.; VALLS, J.F.M. *Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29882>. Acesso em: Setembro de 2019.

COSTA, N.M.S.; SCHULTZE-KRAFT, R. Biogeografia de *Stylosanthes capitata* Vog. e *S. guianensis* Sw. var. *pauciflora*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 11, p. 1547-1554, 1990.

COSTA, NMS. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw.** 469 p. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2006.

CRUTZEN, Paul J. Geology of mankind. In: Paul J. Crutzen: **A Pioneer on Atmospheric Chemistry and Climate Change in the Anthropocene**. Springer, Cham. p. 211-215, 2016.

DA SILVA MATOS, D.; LEME, F.M.; DIAS, E.S.; ARRUDA, R.D.C.O. Anatomia foliar de três espécies de *Stylosanthes* SW. e sua associação com a composição e formação potencial de fitobezoares em bovinos. **Ciência Rural**, v. 43, n. 11, p. 2049-2055, 2013.

DE CASTRO, C.R.T; ALVARENGA, E.M.; DA SILVA, R.F.; REIS, F.P. e REIS, M.S. Armazenamento e vigor de sementes de *Stylosanthes capitata* Vog. **Ceres**, v. 41, n. 233, 2015.

DEMINICIS, B. B.; VIEIRA, H. D.; ARAÚJO, S. A. C.; JARDIM, J. G.; PÁDUA, F. T.; CHAMBELA NETO, A. (2009). Dispersão natural de sementes: importância, classificação e sua dinâmica nas pastagens tropicais. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, p. 35-58, 2009.

DEMINICIS, B.B.; ALMEIDA, J.C.C.; BLUME, M.C.; ARAÚJO, S.A.C.; PÁDUA, F.T.; ZANINE, A.M.; JACCOUD, C.F. Superação da dormência de sementes de oito leguminosas forrageiras tropicais. **Archivos de Zootecnia**, v. 55, n. 212, p. 401-404, 2006.

DIAS FILHO, M. B. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 36p. Embrapa Amazônia Oriental. Documentos. 2014.

DICK, C.W.G.; ETCHELECU, F.; AUSTERLITZ, E. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 3, p. 753-764, 2003.

DIFFENBAUGH, N.S.; SCHERER, M. Observational and model evidence of global emergence of permanent, unprecedented heat in the 20th and 21st centuries. **Climatic Change**, v. 107, n. 3-4, p. 615-624, 2011.

DONOHUE, K. Completing the cycle: maternal effects as the missing link in plant life histories. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1520, p. 1059-1074, 2009.

DONOHUE, K.; CASAS, R.; BURGHARDT, L.; KOVACH, K.; WILLIS, C.G. Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. **Annual review of ecology, evolution and systematics**, v. 41, p. 293-319, 2010.

DUTRA, V. F., LIMA, L. C. P., GARCIA, F. C. P., LIMA, H.C.D.; SARTORI, A.L.B. Geographic distribution patterns of Leguminosae and their relevance for the

conservation of the Itacolomi State Park, Minas Gerais, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 14, n. 1, 2014.

ECKERT, C.G.; KALISZ, S.; GEBER, M.A.; SARGENT, R.; ELLE, E.; CHEPTOU, P.O.; GOODWILLIE, C., et al. Plant mating systems in a changing world. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 1, p. 35-43, 2010.

EDYE, L. A.; MAASS, BRIGITTE L. Recent advances in studies of anthracnose of *Stylosanthes*. I. The biogeography of *Stylosanthes hamata*, *S. scabra* and “*Stylosanthes seabrana*”. **Tropical Grasslands**, v. 31, p. 417-423, 1997.

ELLIS, R.H.; CRAUFURD, P.Q.; SUMMERFIELD, R.J.; ROBERTS, E.H. Linear relations between carbon dioxide concentration and rate of development towards flowering in sorghum, cowpea and soyabean. **Annals of Botany**, v. 75, n. 2, p. 193-198, 1995.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo e uso do Estilosantes-campo-grande**. Embrapa Gado de Corte - Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2007. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/319150/1/Cot105.pdf>> Acessado em: Setembro de 2019.

ERASMUS, M.; PIETERSE, P. J. Improving Seed Germination of *Stylosanthes guianensis* by means of warm water treatment. *South African Journal of Plant and Soil*, v. 18, n. 2, p. 85-86, 2001.

FALKOWSKI, P.; SCHOLES, R.J.; BOYLE, E.E.A.; CANADELL, J.; CANFIELD, D.; ELSER, J. et al. The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system. **Science**, v. 290, n. 5490, p. 291-296, 2000.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Change in the livestock sector**. In: *Livestock in te balance*, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i0680e/i0680e02.pdf>>. Acessado: Setembro de 2019.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities**, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3437e.pdf>>. Acessado: Setembro de 2019.

FENNER, M. The effects of the parent environment on seed germinability. **Seed Science Research**, v. 1, n. 2, p. 75-84, 1991.

FENNER, M.K.; FENNER, M.; THOMPSON, K. **The ecology of seeds**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2005.

FERES, J.M.; SEBBENN A.M; GUIDUGLI, M.C.; MESTRINER, M.A. Mating system parameters at hierarchical levels of fruits, individuals and populations in the Brazilian insect-pollinated tropical tree, *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae). **Conservation Genetics**, v. 13, n. 2, p. 393-405, 2012.

FERNANDES, C.D.; GROF, B.; CHAKRABORTY, S.; VERZIGNASSI, J. R. Estilosantes Campo Grande in Brazil: a tropical forage legume success story. In:

Proceedings of the XX International Grassland Congress, 20, Dublin: Wageningen Academic Publishers, p.223, 2005.

FERRAZ, J.B.S.; FELÍCIO, P.E. Production systems – An example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 323 p., 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995.

FITTER, A.H.; FITTER, R.S. Rapid change in flowering time in british plants. **Science** 296:1689-1691, 2002.

FORREST, J.R.K. Plant–pollinator interactions and phenological change: what can we learn about climate impacts from experiments and observations?. **Oikos**, v. 124, n. 1, p. 4-13, 2015.

FORTUNA-PEREZ, A. P.; SILVA, M. J.; TOZZI, M.G.A. *Stylosanthes* (Leguminosae –Papilionoideae–Dalbergiae) no estado de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**. v. 62, p. 615-628, 2011

FRANKIE, G. W.; HABER, W.A.; OPLER, P.A.; BAWA, K.S. Characteristics and organization of the large bee pollination system in the Costa Rican dry forest. **Characterstics and organization of the large bee pollination system in the Costa Rican dry forest**, p. 411-447, 1983

FREE, J. B. Insect pollination of crops. **Academic press**, 1993.

GALLOWAY, L.F. The effect of maternal and paternal environments on seed characters in the herbaceous plant *Campanula americana* (Campanulaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 5, p. 832-840, 2001.

GAO, C.; REN, X.; MASON, A.S.; LI, J.; WANG, W.; XIAO, M.; FU, D. Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 7, p. 645-661, 2013.

GEPTS, P., BEAVIS, W.D., BRUMMER, E.C., SHOEMAKER, R.C., STALKER, H.T., WEEDEN, N.F.; YOUNG, N.D. Legumes as a model plant family. In: **Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference**. 2005

GHAZOUL, J.; SATAKE, A. Nonviable seed set enhances plant fitness: the sacrificial sibling hypothesis. **Ecology**, v. 90, n. 2, p. 369-377, 2009.

GIANNINI, T. C.; ACOSTA, A. L.; SARAIVA, A. M.; SANTOS, I.A.S.; GARÓFALO, C.A. Impacto de mudanças climáticas em abelhas solitárias: um estudo de caso envolvendo duas espécies de *Centris*. In: **Polinizadores no Brasil - contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo, EDUSP. p. 335-348, 2012.

GIANNINI, T.C.; MAIA-SILVA, C.; ACOSTA, A.L.; JAFFÉ, R.; CARVALHO, A.T. et.al. Protecting a managed bee pollinator against climate change: strategies for an area with extreme climatic conditions and socioeconomic vulnerability. **Apidologie**, v. 48, n. 6, p. 784-794, 2017.

GIORNO, F.; WOLTERS-ARTS, M.; MARIANI, C.; RIEU, I. Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. **Plants**, v. 2, n. 3, p. 489-506, 2013.

GODFRAY, H. C. J., AVEYARD, P., GARNETT, T., HALL, J. W., KEY, T. J., LORIMER, J. et al. Meat consumption, health, and the environment. **Science**, v. 361, n. 6399, p. eaam5324, 2018.

GODFRAY, H.C.J.; GARNETT, T. Food security and sustainable intensification. **Philosophical transactions of the Royal Society B: biological sciences**, v. 369, n. 1639, p. 20120273, 2014.

GONZALEZ-MELER, M.A.; SILVA, L.B.C.; DIAS-DE-OLIVEIRA, E.; FLOWER, C.E.; MARTINEZ, C.A. Experimental Air Warming of a *Stylosanthes capitata*, Vogel Dominated Tropical Pasture Affects Soil Respiration and Nitrogen Dynamics. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 46, 2017.

GOODWILLIE, C.; KALISZ, S.; ECKERT, C.G. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 36, p. 47-79, 2005.

GORDO, O.; SANZ, J.J. Temporal trends in phenology of the honey bee *Apis mellifera* (L.) and the small white *Pieris rapae* (L.) in the Iberian Peninsula (1952–2004). **Ecological Entomology**, vol. 31, n. 3, 261-268, 2006.

GRATANI, L. Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. **Advances in Botany**, 2014.

GROF, B.; FERNANDES, C.D.; VERZIGNASSI, J.R. Recent advances in *Stylosanthes* research in tropical America. In: **International Grassland Congress**. Vol. 20, p. 339, 2005.

GROF, B.; SCHULTZE-KRAFT, R.; MULLER, F. *Stylosanthes capitata* Vog., some agronomic attributes, and resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.). **Tropical Grasslands**, vol. 13, p. 28–37, 1979.

GUIDUGLI, M.C.; FERREIRA-RAMOS, R.; SOUSA, A.C.B.; CIDADE F.W.; MARCONI, T.G.; MESTRINER, M. A.; GROppo, M.; ALZATE-MARIN, A.L. Genetic diversity of *Metrodorea nigra* assessed with microsatellite markers in a small forest remnant. **Genetic and Molecular Research**. Vol. 11, p. 10-16, 2012.

HABERMANN, E.; DIAS DE OLIVEIRA, E.A.; CONTIN, D.R.; MARTIN, J.S.; CURTARELLI, L.; GONZALEZ-MELER, M. A.; MARTINEZ, C.A. Stomatal development and conductance of a tropical forage legume are regulated by elevated [CO₂] under moderate warming. **Frontiers in Plant Science**, vol. 10, n. 609, 2019.

HAMPTON, J. G., BOELT, B., ROLSTON, M. P., CHASTAIN, T.G. Effects of elevated CO₂ and temperature on seed quality. **The Journal of Agricultural Science**, vol. 151, n. 2, 154-162, 2013.

HATFIELD, PRUGER (2015) **Weather and Climate Extremes**. Volume 10, Part A, December 2015, Pages 4-10, 2015.

HEDHLY, A. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. **Environmental and Experimental Botany**, vol. 74, p. 9-16, 2011.

HEGLAND, S. J., NIELSEN, A., LÁZARO, A., BJERKNES, A. L., TOTLAND, O. How does climate warming affect plant-pollinator interactions?. **Ecology letters**, vol. 12, n. 2, p. 184-195, 2009.

HENRY, R. J. **Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants**. Cabi Publishing, 332 p., 2005.

HIKOSAKA, K., KINUGASA, T., OIKAWA, S., ONODA, Y., HIROSE, T. (2010). Effects of elevated CO₂ concentration on seed production in C₃ annual plants. **Journal of Experimental Botany**, vol. 62, n. 4, p. 1523-1530, 2010

HOLSINGER, K.E. Pollination biology and the evolution of mating systems in flowering plants. **Evolutionary biology**, vol. 29, p. 107-149, 1996.

HUANG, Z., LIU, S., BRADFORD, K. J., HUXMAN, T. E., & VENABLE, D. L. The contribution of germination functional traits to population dynamics of a desert plant community. **Ecology**, vol. 97, n. 1, p. 250-261, 2016.

HUNGRIA, M., FRANCHINI, J. C., CAMPO, R. J., CRISPINO, C. C., MORAES, J. Z., SIBALDELLI, R. N., MENDES, I. C., ARIHARA, J.. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, vol. 86, n. 4, p.927-939, 2006.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Censo agropecuário 2017 - Resultados preliminares. - Rio de Janeiro. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3093/agro_2017_resultados_preliminares.pdf> Acessado: Setembro de 2019.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate Change: Mitigation of Climate Change. Working Group III contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Fourth Assessment Report, Geneva, 36 p., 2007.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate Change: The physical science basis. The Twelfth Session of Working Group I (WGI-12) contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Fifth Assessment Report, Stockholm, Sweden. 36 p., 2013.

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate Change: Mitigation of Climate Change. Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Working**. Geneva, 2014.

- JABLONSKI, L. M., WANG, X., CURTIS, P.S. Plant reproduction under elevated CO₂ conditions: a meta-analysis of reports on 79 crop and wild species. **New Phytologist**, vol. 156, n. 1, p. 9-26, 2002.
- JAFFÉ, R., VEIGA, J. C., POPE, N. S., LANES, É. C., CARVALHO, C. S., ALVES, R., et al. Landscape genomics to the rescue of a tropical bee threatened by habitat loss and climate change. **Evolutionary Applications**. vol. 12, n. 6, p. 1164-1177, 2019.
- JANK, L., BARRIOS, S. C., DO VALLE, C. B., SIMEÃO, R. M., ALVES, G. .. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, vol. 65, n. 11, p. 1132-1137, 2014.
- JARVIS, A., LANE, A., HIJMANS, R. J. The effect of climate change on crop wild relatives. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, vol. 126, v. 1-2, p. 13-23, 2008.
- KALIA, R. K.; RAI, M.K., KALIA; S., SINGH; R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, vol. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.
- KAMEYAMA, Y., KUDO, G. Flowering phenology influences seed production and outcrossing rate in populations of an alpine snowbed shrub, *Phyllodoce aleutica*: effects of pollinators and self-incompatibility. **Annals of Botany**, vol. 103, n. 9, p. 1385-1394, 2009.
- KIMBALL, B. A., CONLEY, M. M., WANG, S., LIN, X., LUO, C., MORGAN, J., & SMITH, D. Infrared heater arrays for warming ecosystem field plots. **Global Change Biology**, vol. 14, n. 2, p. 309-320, 2008.
- KOTCHETKOFF-HENRIQUES, O. **Characterization of the Natural Vegetation in Ribeirão Preto, SP: Bases for Conservation**. DSc thesis, University of São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/dissertacoes-teses/6724/caracterizacao-vegetacao-natural-ribeirao-preto/>>
- LAWRENCE, D.; VANDECAR, K. Effects of tropical deforestation on climate and agriculture. **Nature Climate Change**. vol. 5, p. 27–36, 2015.
- LEWIS, G., SCHIRE, B., MACKINDER, B., LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew, Royal Botanic Gardens. 577p, 2005.
- LIU, P., GUO, W., JIANG, Z., PU, H., FENG, C., ZHU, X., PENG, Y., et. al Effects of high temperature after anthesis on starch granules in grains of wheat (*Triticum aestivum* L.). **The Journal of agricultural science**, vol. 149, n. 2, p. 159-169, 2011.
- LONG, S.P.; AINSWORTH, E.A.; ROGERS, A.; ORT, D.R. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. **Annu. Rev. Plant Biol.**, vol. 55, pp. 591-628, 2004.
- LOVETT DOUST, J, & L. LOVETT DOUST, L. (1988). *Plant Reproductive Ecology. Patterns and Strategies*. Oxford University Press.
- MACHADO, L. A., LEMPP, B., DO VALLE, C. B., JANK, L., BATISTA, L. A. R., POSTIGLIONI, S. R., RESENDE, R. M. S., FERNANDES, C. D., et al. **Principais**

espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. Embrapa Pecuária Sudeste-Capítulo em livro científico (ALICE), 2010. Disponível em:

MAGUIRE, J.D. Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor 1. **Crop science**, vol. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MALUF, R. P., TEIXEIRA, J. G., ANACLETO-BONIFACIO, F., MARTINEZ, C. A., ALZATE-MARIN, A. L., **Effects of climate change on floral visitors of the leguminous *Stylosanthes capitata* Vogel.** In: XII Encontro Sobre Abelhas, 2018, Uberlândia. Anais XII Encontro Sobre Abelhas, 2018.

MARENGO, J.A., JONES, R., ALVES, L.M., VALVERDE, M.C. Future change of temperature and precipitation extremes in South America as derived from the PRECIS regional climate modeling system. **International Journal of Climatology: A Journal of the Royal Meteorological Society**, vol. 29, n. 15, p. 2241-2255, 2009.

MARTHA, J.R., ALVES, G.B., CONTINI, E. Land-saving approaches and beef production growth in Brazil. **Agricultural Systems**, vol. 110, p. 173-177, 2012.

MARTINELLI, L.A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. **Ecological applications**, vol. 18, n. 4, 885-898. 2008.

MARTINEZ, C.A., OLIVEIRA, E.D., MELLO, T.R.P., ALZATE-MARIN, A.L. Respostas das plantas ao incremento atmosférico de dióxido de carbono e da temperatura. **Revista Brasileira de Geografia Física**, vol. 8, n. 6, p. 635-650, 2015.

MARTINEZ, C.A.; BIANCONI, M.; SILVA, L.; APPROBATO, A.; LEMOS, M. et al.. Moderate warming increases PSII performance, antioxidant scavenging systems and biomass production in *Stylosanthes capitata* Vogel. **Environmental and experimental botany**, vol. 102, p. 58-67, 2014.

MASLIN, M. **Global warming: a very short introduction.** OUP Oxford, 2008.

MIGLIETTA, F.; PERESSOTTI, A.; VACCARI, F.P.; ZALDEI, A.; DEANGELIS, P.; SCARASCIA-MUGNOZZA, G. Free-air CO₂ enrichment (FACE) of a poplar plantation: the POPFACE fumigation system. **New Phytologist**, vol. 150, n. 2, p. 465-476, 2001.

MILES, J.W. Natural outcrossing in *Stylosanthes capitata*. **Tropical Grassland**. Vol. 17, p. 114-117, 1983.

MOUSSEAU, T.A.; FOX, C.W. The adaptive significance of maternal effects. **Trends in Ecology & Evolution**, vol. 13, n. 10, p. 403-407, 1998.

NAZARENO, A.G.; REIS, M.S.D.. Linking phenology to mating system: exploring the reproductive biology of the threatened palm species *Butia eriospatha*. **Journal of Heredity**, vol. 103, n. 6, p. 842-852, 2012.

NEPSTAD, D., SOARES-FILHO, B. S., MERRY, F., LIMA, A., MOUTINHO, P., CARTER, J., BOWMAN M., CATTANEO, A., et al. The end of deforestation in the **Brazilian Amazon.** **Science**, vol. 326, n. 5958, p. 1350-1351, 2009.

NOA - National Oceanic and Atmospheric Administration. **2018 marks three consecutive years of record warmth for the globe.** Disponível em: <<https://www.nasa.gov/press-release/nasa-noaa-data-show-2016-warmest-year-on-record-globally>> Acessado: setembro de 2019.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S.. How many flowering plants are pollinated by animals?. **Oikos**, vol. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENEALX 6: genetics analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.

PETANIDOU, T.; SMETS, E. Does temperature stress induce nectar secretion in Mediterranean plants?. **New Phytologist**, v. 133, n. 3, p. 513-518, 1996.

PORCHER, E.; LANDE, R. Reproductive compensation in the evolution of plant mating systems. **New Phytologist**, vol. 166, n. 2, p.673-684, 2005.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W.E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, vol. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

PRADO, C. H. B. A., DE CAMARGO-BORTOLIN, L. H. G., CASTRO, É., & MARTINEZ, C. A. Leaf dynamics of *Panicum maximum* under future climatic changes. **PloS one**, vol. 11, n. 2, e0149620, 2016.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity**, vol. 47, n. 1, p. 35, 1981.

RODRIGUES, R.A.R., DE MELLO, W.Z., DA CONCEIÇÃO, M.C.G., DE SOUZA, P. A., SILVA, J. J. N.. Dinâmica do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas e Florestais Tropicais e seu Impacto na Mudança do Clima. **Rev. Virtual Quím.** Vol. 9, n. 5, p. 1868-1886, 2017.

ROSENZWEIG, C., KAROLY, D., VICARELLI, M., NEOFOTIS, P., WU, Q., et al.. Attributing physical and biological impacts to anthropogenic climate change. **Nature**, vol.453, n. 7193, p. 353, 2008.

SAAVEDRA, F.; INOUE, D.W.; PRICE, M. V.; HARTE, J. Changes in flowering and abundance of *Delphinium nuttallianum* (Ranunculaceae) in response to a subalpine climate warming experiment. **Global Change Biology**, v. 9, n. 6, p. 885-894, 2003.

SÆBØ, A.; MORTENSEN, L.M. Growth, morphology and yield of wheat, barley and oats grown at elevated atmospheric CO₂ concentration in a cool, maritime climate. **Agriculture, ecosystems & environment**, vol. 57, n. 1, p. 9-15, 1996.

SANTOS, L.G. **Análise comparativa da pureza genética das leguminosas forrageiras e *Stylosanthes capitata* Vog. e *Stylosanthes macrocephala* MB Ferr. Et Sousa Costa utilizando marcadores moleculares.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2014.

SANTOS, M. O., SASSAKI, R. P., CHIARI, L., RESENDE, R. M. S., SOUZA, A. P. Isolation and characterization of microsatellite loci in tropical forage *Stylosanthes capitata* Vogel. **Molecular Ecology Resources**, vol. 9, n. 1, p.192-194, 2009.

SANTOS-GARCIA, O.M., RESENDE, R.M.S., CHIARI, L., ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Euphytica**, vol. 178, n. 2, p. 185-193, 2011.

SARAIVA, A. M.; ACOSTA, A. L.; GIANNINI, T. C.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O.; DRUMMOND, M. S.; et al. **Influência das alterações climáticas sobre a distribuição de algumas espécies de *Melipona* no Brasil**. In: Polinizadores no Brasil - contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo, EDUSP. p. 349-360, 2012.

SCAVEN, V.L.; RAFFERTY, N.E. Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. **Curr. Zool.** Vol. 59, p. 418–426, 2013.

SCHAUBER, E.M., KELLY, D., TURCHIN, P., SIMON, C., LEE, W.G., ALLEN, R.B. et al. Masting by eighteen New Zealand plant species: the role of temperature as a synchronizing cue. **Ecology**, Vol. 83, p. 1214–1225, 2002.

SCHULTZE-KRAFT, R.; KELLER-GREIN, G. (1994). **Screening *Stylosanthes* in Latin America: The CIAT-RIEPT experience**. In: *Stylosanthes* as a forage and fallow crop. Proceedings of the Regional Workshop on the Use of *Stylosanthes* in West Africa, held in Kaduna, Nigeria, p. 26–31, 1992.

SENEWEERA, S., MILHAM, P., CONROY, J.. Influence of elevated CO₂ and phosphorus nutrition on the growth and yield of a short-duration rice (*Oryza sativa* L. cv. Jarrah). **Functional Plant Biology**, vol. 21, n. 3, p. 281-292, 1994.

SIDDIQUE, K.H.M.; LOSS, S.P.; REGAN, K.L.; JETTNER, R.L. Adaptation and seed yield of cool season grain legumes in Mediterranean environments of south-western Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, vol. 50, n. 3, p. 375-388, 1999.

SILVA, F.A.S.; VERZIGNASSI, J., COSTA, J.A.A., FERNANDES, C., VICENTINI, R. et al. **Longevidade de sementes de *Stylosanthes* submetidas à escarificação térmica**. In: **Embrapa Gado de Corte-Resumo em anais de congresso**. In: Jornada Científica Embrapa Gado de Corte, 15, Campo Grande, MS. Brasília, DF: Embrapa. 80 p., 2019.

SILVERTON, J.; D. CHARLESWORTH, D. **Introduction to plant population biology**. Blackwell Publishing, USA. Fourth edition. p. 177. 2001

SIQUEIRA, O.D.; FARIAS, J.D.; SANS, L.A. Potential effects of global climate change for Brazilian agriculture: applied simulation studies for wheat, maize and soybeans. Implications of climate change for international agriculture: **Crop Modeling Study**, pp.1-28, 1994.

SOUZA, F.H.; MARCOS-FILHO, J.. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Brazilian Journal of Botany**, vol. 24, n. 4, p. 365-375, 2001.

SPEHAR, C.R.; TRECENTI, R. Desempenho agrônômico de espécies tradicionais e inovadoras da agricultura em semeadura de sucessão e entressafra no cerrado do planalto central brasileiro. **Bioscience Journal**, vol. 27, n. 1, 2011.

SPRINGER, C. J.; WARD, J.K. Flowering time and elevated atmospheric CO₂. **New Phytologist**, vol. 176, n. 2, p. 243-255, 2007.

STACE, H.M.. Breeding systems in *Stylosanthes*. I. Observations of outcrossing in *S. scabra* at an alcohol dehydrogenase locus. **Australian Journal of Agricultural research**, vol. 33, n.1, p. 87-96, 1982.

STACE, H.M.; EDYE, L.A (1984). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Elsevier. Sydney: Academic Press, 636p.

STEFFAN-DEWENTER, I.; SCHIELE, S. Do resources or natural enemies drive bee population dynamics in fragmented habitats. **Ecology**, v. 89, n. 5, p. 1375-1387, 2008.

STEFFEN, W., SANDERSON, R.A., TYSON, P. D., JÄGER, J., MATSON, P. A., MOORE, B. et al. Global change and the earth system: a planet under pressure. **Springer Science & Business Media**, 2006.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucl Acids Res.** vol. 12, p. 4127–4138, 1984.

TEIXEIRA, J.S.G.; ANACLETO-BONIFACIO, F. B. ; ALZATE-MARIN, A.L. e MARTINEZ, C. A.H. Effects of warming and elevated CO₂ on floral visitors of the leguminous *Stylosanthes capitata* VOGEL. In: **XI Encontro Sobre abelhas**, 2015, Ribeirão Preto. Anais XI Encontro sobre abelhas, 2015.

THOMAS, R.J. (1995). Role of legumes in providing N for sustainable tropical pasture systems. **Plant and Soil** 174:103-118.

TILIO NETO, P. D. (2010). **Ecopolítica das mudanças climáticas: o IPCC e o ecologismo dos pobres**. [online]. Rio de Janeiro: Centro Edelstein de Pesquisas Sociais, 155p., 2010. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/x9z8z/pdf/tilio-9788579820496.pdf>> Acessado: Setembro de 2019.

TOZZI, A.M.G.A. **Papilionoideae** In: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 8, pp: 167-397, 2016.

TURCHETTO, C.; LIMA, J.S.; RODRIGUES, D.M.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B.. Pollen dispersal and breeding structure in a hawkmoth-pollinated Pampa grasslands species *Petunia axillaris* (Solanaceae). **Annals of Botany**, vol. 115, n. 6, pp. 939-948, 2015.

UBIALI, D.G., SILVA, R.G., OLIVEIRA, L.P., MORAES, L.G.D., CALDEIRA, F. H., PESCADOR, C.A et al. Obstrução intestinal em bovinos associada ao consumo de *Stylosanthes* sp. (Fabaceae Papilionoideae). **Pesq. Vet. Bras**, vol. 33, n. 2, p. 148-154. 2013.

VALLEJO-MARÍN, M.; HISCOCK, S.J. Hybridization and hybrid speciation under global change. **New Phytologist**, vol. 211, n. 4, p. 1170-1187, 2016.

VERZIGNASSI, J.R.; FERNANDES, C.D. **Estilosantes Campo Grande: situação atual e perspectivas**. Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2002.

VIANA, B.F., KLEINERT, A.M.; SILVA, F.O. Ecology of *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *cearensis* (Hymenoptera, Anthophoridae) in Abaeté sand dunes, Salvador, Bahia. *Iheringia. Série Zoologia*, vol. 92, n. 4, p. 47-57, 2002.

VIEIRA, M.L.C., SANTINI L., DINIZ, A.L. MUNHOZ, C.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**. Vol. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

VOEGELE, A.; GRAEBER, K.; ORACZ, K.; TARKOWSKÁ, D.; JACQUEMOUD, D.; TUREČKOVÁ, V., Embryo growth, testa permeability, and endosperm weakening are major targets for the environmentally regulated inhibition of *Lepidium sativum* seed germination by myrigalone A. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 14, p. 5337-5350, 2012.

VOGLER, D.W.; KALISZ, S. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. **Evolution**, vol. 55, n. 1, p.202-204, 2001.

WHEELER, T.; REYNOLDS, C. Predicting the risks from climate change to forage and crop production for animal feed. **Animal Frontiers**. Vol. 3, p.36-41, 2013

WHEELER, T.; VON BRAUN, J. Climate change impacts on global food security. **Science**, vol. 341, n. 6145, p. 508-513, 2013.

WILLIAMS, R.J., REID, R. SCHULTZE-KRAFT, N.M; SOUSA COSTA, B.D. **Natural Distribution of Stylosanthes**. In: Stace, H. & Edye, L.A. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Elsevier. Sydney: Academic Press, 636p. 1984.

WILLIS, K.; MCELWAIN, J. The evolution of plants. Oxford University Press, 2014.

WU, Z.; DIJKSTRA, P.; KOCH, G.W.; PENUELAS, J.; HUNGATE, B.A. Responses of terrestrial ecosystems to temperature and precipitation change: a meta-analysis of experimental manipulation. **Global Change Biology** vol. 17, p. 927-942, 2011.

WULFF, R.D.; CACERES, A.; SCHMITT, J. Seed and seedling responses to maternal and offspring environments in *Plantago lanceolata*. **Functional Ecology** vol. 8, p. 763–769, 1994.

XU, Z.; SHIMIZU, H.; YAGASAKI, Y.; ITO, S.; ZHENG, Y.; ZHOU, G. Interactive effects of elevated CO₂, drought, and warming on plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, vol. 32, n. 4, p. 692-707, 2013.

ZAPPI, D. C., FILARDI, F. L. R., LEITMAN, P., SOUZA, V. C., WALTER, B. M., et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, 66(4): 1085-1113, 2015.

ANEXOS: Resultados

Diferenças entre matrizes e progênes: Teste t-Student. Conforme sumarizado na Tabela A1, não houveram diferenças intergeracionais nos parâmetros número de alelos (A), número de alelos efetivos (Ae), Heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho).

Tabela A1. Resultado do Teste T-Student comparando a médias dos parâmetros de diversidade de matrizes vs. Progênes.

Número de alelos (A)			
C matriz vs C progênie		eCO ₂ matriz vs. eCO ₂ progênie	
<i>p-value</i>	0,43	<i>p-value</i>	0,36
<i>t-value</i>	0,18	<i>t-value</i>	0,37
eT matriz vs. eT progênie		eCO ₂ +eT matriz vs. eCO ₂ +eTprogênie	
<i>p-value</i>	0,39	<i>p-value</i>	0,38
<i>t-value</i>	0,28	<i>t-value</i>	0,30
Número efetivo de alelos (Ae)			
C matriz vs C progênie		eCO ₂ matriz vs. eCO ₂ progênie	
<i>p-value</i>	0,48	<i>p-value</i>	0,49
<i>t-value</i>	0,04	<i>t-value</i>	0,03
eT matriz vs. eT progênie		eCO ₂ +eT matriz vs. eCO ₂ +eTprogênie	
<i>p-value</i>	0,48	<i>p-value</i>	0,47
<i>t-value</i>	0,04	<i>t-value</i>	0,08
Heterozigosidade Observada (Ho)			
C matriz vs C progênie		eCO ₂ matriz vs. eCO ₂ progênie	
<i>p-value</i>	0,45	<i>p-value</i>	0,49
<i>t-value</i>	0,13	<i>t-value</i>	0,02
eT matriz vs. eT progênie		eCO ₂ +eT matriz vs. eCO ₂ +eTprogênie	
<i>p-value</i>	0,41	<i>p-value</i>	0,46
<i>t-value</i>	0,23	<i>t-value</i>	0,10
Heterozigosidade Esperada (He)			
C matriz vs C progênie		eCO ₂ matriz vs. eCO ₂ progênie	
<i>p-value</i>	0,45	<i>p-value</i>	0,46
<i>t-value</i>	0,13	<i>t-value</i>	0,08
eT matriz vs. eT progênie		eCO ₂ +eT matriz vs. eCO ₂ +eTprogênie	
<i>p-value</i>	0,50	<i>p-value</i>	0,43
<i>t-value</i>	0,00	<i>t-value</i>	0,17

Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na população de matrizes verificamos que a heterozigosidade observada para cada locus foi menor que a heterozigosidade esperada (com exceção do locus E12), sugerindo que neste grupo amostral há maior proporção de homozigotos do que em uma população em equilíbrio

de Hardy-Weinberg (Tabela A2). O mesmo foi observado na população de progênies (considerando as progênies de todos os tratamentos), a heterozigosidade observada foi menor que a esperada (com exceção também para o marcador E12), demonstrando que a população da prole, também possui menor proporção de heterozigotos do que seria esperado em uma população em modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). O teste do qui-quadrado foi significativo ($p < 0,001$) para todos os locus, indicando que a proporção de heterozigosidade esperada difere da observada e que, portanto, a população não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela A2. Proporções de heterozigosidade esperada e observada nos sete locus microssatélite utilizados nas populações de matrizes e progênies. Valores do teste de exato de Fisher para aderência ao Modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$).

<i>Matrizes (n=40)</i>							
<i>Locus</i>	Ho	He	He-Ho	FIS	Teste EHW		
					χ^2	GL	p
<i>A2A</i>	0,356	0,734	0,378	0,475	53,63	8	<0,001
<i>E4</i>	0,150	0,718	0,568	0,761	96,62	8	<0,001
<i>G9</i>	0,100	0,720	0,620	0,846	107,15	8	<0,001
<i>F2</i>	0,475	0,672	0,197	0,238	15,66	8	<0,001
<i>G12</i>	0,400	0,824	0,424	0,455	31,66	8	<0,001
<i>E12</i>	0,950	0,903	-0,047	-0,106	127,53	8	<0,001
<i>H5</i>	0,078	0,771	0,693	0,888	127,53	8	<0,001
<i>Progênies (n=640)</i>							
<i>Locus</i>	Ho	He	Ho-He	FIS	Teste EHW		
					χ^2	GL	p
<i>A2A</i>	0,303	0,675	0,372	0,548	127,54	8	<0,001
<i>E4</i>	0,099	0,652	0,553	0,848	127,54	8	<0,001
<i>G9</i>	0,089	0,659	0,570	0,864	127,54	8	<0,001
<i>F2</i>	0,325	0,617	0,292	0,470	127,54	8	<0,001
<i>G12</i>	0,305	0,722	0,417	0,574	127,54	8	<0,001
<i>E12</i>	0,954	0,860	-0,094	-0,113	127,54	8	<0,001
<i>H5</i>	0,076	0,682	0,606	0,887	127,54	8	<0,001

Teste de Desequilíbrio de Ligação

A Tabela A3 apresenta o resultado do teste de desequilíbrio de ligação dos alelos. Todos os valores de probabilidade observados são maiores que o limite de significância do teste (0,000347), indicando, portanto, que todos os pares de locus analisados (nas gerações de plantas matrizes e na geração de progênies) não estão ligados e segregam de forma independente.

Tabela A3. Resultado do teste de desequilíbrio de ligação para os pares de locus SSR de *S. capitata*, utilizados nesta pesquisa. Valores da tabela são probabilidades baseadas em 1680 permutações. Limite de significância com correção de Bonferroni é de 0.000347 ($\alpha=0,05$).

<i>Pares de locus</i>	<i>Matrizes (n=40)</i>				<i>Progênies (n=640)</i>			
	C	eCO₂	eT	eCO₂+eT	C	eCO₂	eT	eCO₂+eT
<i>A2A x E4</i>	1,00000	0,17560	0,23869	0,50536	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>A2A x G9</i>	0,21667	0,86905	0,25774	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>A2A x F2</i>	0,21667	1,00000	0,18393	0,77619	0,00060	0,00060	0,00179	0,00060
<i>A2A x G12</i>	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>A2A x E12</i>	1,00000	1,00000	0,50357	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>A2A x H5</i>	0,36667	0,62798	0,91488	0,37440	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>E4 x G9</i>	0,47917	0,54702	0,10476	0,56667	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>E4 x F2</i>	1,00000	0,38333	0,35952	0,89167	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>E4 x G12</i>	0,07679	0,41369	1,00000	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>E4 x E12</i>	1,00000	0,94226	0,77917	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>E4 x H5</i>	0,72917	0,89702	0,64048	0,15536	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>G9 x F2</i>	0,41786	1,00000	0,34464	0,27560	0,00060	0,00060	0,01488	0,00060
<i>G9 x G12</i>	0,45595	1,00000	0,31726	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>G9 x E12</i>	0,20595	0,78452	0,35119	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>G9 x H5</i>	0,22024	0,65357	0,14643	0,47083	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>F2 x G12</i>	1,00000	1,00000	0,08214	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>F2 x E12</i>	1,00000	1,00000	0,64405	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>F2 x H5</i>	0,62976	0,14821	0,89702	0,84583	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>G12 x E12</i>	0,21607	1,00000	0,25536	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>G12 x H5</i>	0,72857	1,00000	1,00000	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060
<i>E12 x H5</i>	0,35476	1,00000	1,00000	1,00000	0,00060	0,00060	0,00060	0,00060

ANEXOS: Artigos

Artigo 1 (Publicado): Diagnostic fingerprints ISSR/SSR for tropical leguminous species *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*

Ana Lilia Alzate-Marin, Carolina Costa-Silva, Priscila Marllys Sá Rivas, Fernando Bonifacio-Anacleto, Leticia Gobett Santos, Rômulo Maciel de Moraes Filho, Carlos Alberto Martinez

<http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0252>

Scientia Agricola, vol.77, no.3, 2020

Impact fator 2017/2018: 1.38

Diagnostic fingerprints ISSR/SSR for tropical leguminous species *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*

Ana Lilia Alzate-Marin^{1*}, Carolina Costa-Silva¹, Priscila Marlys Sá Rivas¹, Fernando Bonifacio-Anacleto¹, Leticia Gobett Santos², Rômulo Maciel de Moraes Filho³, Carlos Alberto Martínez²

¹Universidade de São Paulo/FMRP – Lab. de Genética Vegetal – Depto. de Genética, Av. Bandeirantes, 3900 – 14049-900 – Ribeirão Preto, SP – Brasil.

²Universidade de São Paulo/FFCLRP – Depto. de Biologia – Lab. de Fisiologia Vegetal.

³Universidade Federal Rural de Pernambuco – Depto. de Agronomia, R. Dom Manuel de Medeiros, s/n – 52171-900 – Recife, PE – Brasil.

*Corresponding author <anaalzate@fmrp.usp.br>

Edited by: Gerson Barreto Mourão

Received July 30, 2018

Accepted October 30, 2018

ABSTRACT: *Stylosanthes capitata* Vogel and *Stylosanthes macrocephala* M.B.Ferreira & Sousa Costa are two forage leguminous species of agronomic importance for animal husbandry in tropical environments. The physical mixture of both species (80 % *S. capitata* and 20 % *S. macrocephala*) comprises the commercial cultivar “Estilosantes Campo Grande”. However, proximity of fields for seed production may contaminate seed lots, compromising seeds quality. The combined use of dominant and co-dominant molecular markers is an appropriate strategy to certificate genetic purity and perform diversity studies of cultivars. In this research, a set of ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat polymorphic DNA) and SSR (Simple Sequence Repeat polymorphic DNA) molecular markers were standardized to characterize *S. capitata* and *S. macrocephala* species and evaluate the genetic purity of commercial samples. Four ISSR markers (UBC 2, 864, 885, 886) and SSR marker SC18-01 G4B showed precise species-specific electrophoretic fingerprints for both species. Electrophoretic patterns of ISSR molecular markers should be displayed first to confirm the sample identification. The structure analysis showed that the less contaminated sample was *S. capitata* with 97 % of its genetic composition assigned to a single genetic cluster vs. 95 % for *S. macrocephala*. *S. capitata* has greater genetic diversity (ISSR_{He}:0.292; SSR_{He}:0.57) than *S. macrocephala* (ISSR_{He}:0.285; SSR_{He}:0.16); however, this difference was only significant with SSR molecular markers. As these genetic resources have considerable ecological, agronomic and economic importance, tools for accurate species identification and genetic studies are essential for further seed multiplication, as well as for improvement and conservation of cultivars.

Keywords: genetic purity, genetic diversity, seed production

Introduction

The *Stylosanthes* genus belongs to the family Leguminosae and subfamily Papilionoideae (Azani et al., 2017). Despite its high intraspecific and interspecific diversity, which has hindered its taxonomy (Mannetje, 1984; Maass and Sawkins, 2004; Stappen et al., 2002), 43 species of the genus *Stylosanthes* are recognized by the International Legume Database & Information Service - ILDIS (Roskov et al., 2018). In Brazil, 31 species occur and 12 are endemic (Costa and Valls, 2015). However, agricultural use is limited to species *S. guianensis* (Aubl.) Sw. (diploid), *Stylosanthes capitata* Vogel (tetraploid) and *Stylosanthes macrocephala* M.B.Ferreira & Sousa Costa (diploid) (Maass and Sawkins, 2004; Jank et al., 2011; Roskov et al., 2018).

In tropics, both species *S. capitata* and *S. macrocephala* grow well on acid, infertile soils in sub-humid savannah environments and exhibit tolerance to anthracnose (Grof et al., 1979; Miles and Lascano, 1997). Two cultivars were released, one in Colombia, *S. capitata* cv. Capica (CIAT 10280, CPAC 1618) and one in Brazil, *S. macrocephala* cv. Pioneiro (CIAT 1281 = BRA-003697); however, their adoption was constrained by weak agronomic performance (Miles and Lascano, 1997). Later, it was released in Brazil the cultivar named ‘Estilosantes Campo Grande’, formed by the physical mixture of anthracnose resistant accessions of *S. macrocephala* (20 %), with productive accessions of *S. capitata* (80 %) (Embra-

pa, 2000; Cook et al., 2005; Jank et al., 2011), and it is currently the most used commercial cultivar. However, because of the proximity of fields for seed production of *S. capitata* and *S. macrocephala*, and their morphological similarity, contamination of seed lots may occur, compromising seeds quality.

The combined use of dominant (as ISSR-Inter-Simple Sequence Repeat) and co-dominant (as SSR-Simple Sequence Repeat) molecular markers is an adequate strategy to certificate genetic purity and perform diversity studies on cultivars, both for scientific and commercial purposes. Thus, this study aimed to standardize a set of ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat polymorphic DNA) and SSR (Simple Sequence Repeat polymorphic DNA) molecular markers to characterize the forage leguminous species *Stylosanthes capitata* Vogel and *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferreira & Sousa Costa that comprise cultivar ‘Estilosantes Campo Grande’ and evaluate genetic purity of commercial samples.

Materials and Methods

Plant material

Seeds of *Stylosanthes capitata* Vogel and *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferreira & Sousa Costa species used for this research were from two separated commercial seed lots, kindly provided by a Brazilian commercial seed company that uses these species to comprise the

mixed commercial cultivar named "Estilosantes Campo Grande". Additionally, seeds of *S. macrocephala* cv. Pioneiro were used for fingerprint confirmation.

Sampling of plant material

Leaf samples from 80 adult individual plants of *S. capitata* were collected in the experiment conducted in the year 2015 under the "Temperature Free-Air Controlled Enhancement and free-air carbon dioxide enrichment" facility (Trop-T-FACE), installed in field conditions, in the municipality of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil (21°10'30" S, 47°48'38" W, altitude: 546 m). For comparison, 80 samples of seeds of the commercial *S. macrocephala* and four samples of seeds of *S. macrocephala* cv. Pioneiro were germinated *in vitro* and their seedlings were sampled and stored at -20 °C for further analysis. Also, foliar samples of 117 adult plants that showed a different morphology in the field, evidencing seed lot contamination, were stored at -20 °C for further identification.

DNA extraction and ISSR/SSR amplifications

Total genomic DNA was extracted from the leaves of each plant sampled using the method described by Alzate-Marin et al. (2009), except for adult field plants contaminated with *Stylosanthes* sp. that were extracted

using a commercial DNeasy Plant Mini Kit, since the previous protocol did not work for these samples.

ISSR/SSR primers characterization

Fifteen ISSR markers were tested for amplification of *S. capitata* and *S. macrocephala* according to the official list published by the University of British Columbia in Canada (Table 1). In addition, fifteen SSR primer pairs developed by Santos et al. (2009a; 2011) were tested and standardized for amplification of *S. capitata* and cross-transferability to *S. macrocephala* (Tables 1 and 2).

The SSR/ISSR PCR amplifications were similar to those reported in Moraes Filho et al. (2015). Since SSR amplifications with the annealing temperature previously described for these primers (60 °C) only worked in about 47 % of our amplifications, we tested annealing temperatures between 55 and 62 °C. The temperatures that were successful in the amplification of *S. capitata* were used to confirm cross-transferability of these markers in *S. macrocephala* (Santos et al., 2009a; 2011). The PCR products were denatured and separated in 8 % denaturing polyacrylamide gels (SSR) and 8 % non-denaturing polyacrylamide gels (ISSR) stained with silver nitrate (Sanguinetti et al., 1994). Alleles were sized by comparison to a standard 10-bp (SSR) and 50-bp (ISSR) DNA ladder.

Table 1 – Sequences of the molecular markers tested.

Loci	ISSR	Loci	SSR
	Primer ^a		Primer Forward and Reverse
UBC-1	ACACACACACACACT	SC 18-01 B3 ^a	5' GGCTAAAGAACGGCTAATG 3' 5' TCGAAAGATCCAAGAACAAA 3'
UBC-2	GAGAGAGAGAGAGAT	SC 18-01 C7B ^a	5' CGACCAAAGGGGATGTC 3' 5' AAGTAGCAGCGGCGAGACC 3'
UBC-13	CTCTCTCTCTCTCTT	SC 18-01 E11 ^a	5' TGGAGACAACACCCTTATG 3' 5' ATTCTATTACTCTTGCCTTTTCT 3'
UBC-820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	SC 18-01T F11A ^a	5' CTCTTTTATCCCCACCTTTTT 3' 5' AGCACACTCTTTGATGATGAG 3'
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	SC 18-01 G4B ^a	5' GCATAGCAGCATAGGTAGTAAA 3' 5' ATGCCAGGGCTGATAGAAG 3'
UBC-845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	SC 18-01 A2A ^b	5' AGCAGCATAGGGAATAAAAT 3' 5' CAAAGGCCTAATCAACTGTG 3'
UBC-851	GTGTGTGTGTGTGTGYG	SC 18-01 B4 ^b	5' GCTTAGGCCTTATCCAGAA 3' 5' TTGAATTTGTTATTGCTACTACTT 3'
UBC-858	TGTGTGTGTGTGTGRT	SC 18-01 E4 ^b	5' CGGCAACTGGGAAAATAA 3' 5' ATGGGTAATCACAAATCTTCAG 3'
UBC-860	TGTGTGTGTGTGTGRA	SC 18-02 E12 ^b	5' AGGGGAAGGGCAAATGGT 3' 5' GCATAGATGGCAAACAGAGACA 3'
UBC-862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	SC 18-01T F2 ^b	5' CTGACCCACCTAATGAGAAA 3' 5' AGCAAAACAAAACAACAACACTA 3'
UBC-864	ATGATGATGATGATGATG	SC 18-01T G9 ^b	5' TCCAGCTAAAGGGCAACACA 3' 5' CCACCGCACACCAGAGATT 3'
UBC-866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	SC 18-01T G12A ^b	5' ATGCTGATTTTTGGCTCTTTT 3' 5' CCCCTTTTGAACGGATTG 3'
UBC-885	BHBGAGAGAGAGAGAGA	SC 18-02 H1 ^b	5' GTCATTGTCGTCGTCACC 3' 5' ACCGCATAGCTGTCTTTATT 3'
UBC-886	VDVCTCTCTCTCTCTCT	SC 18-01T H4 ^b	5' GGTATATGGGAGTCTTGTCT 3' 5' TTTGTTTGTGCTTTTGTGTA 3'
UBC-897	CCGACTCGAGNNNNNATGTGG	SC 18-01 H5 ^b	5' GCATCATTTGCATTTGTTTT 3' 5' CTATCACCTCCATACCTTATC 3'

^aN = (A,G,C,T), R = (A,G), Y = (C,T), B = (C,G,T), D = (A,G,T), H = (A,C,T), V = (A,C,G). ^aSantos et al. (2009a); ^bSantos et al. (2011).

Table 2 – SSR molecular markers developed for *S. capitata* (Santos et al., 2009a; 2011), standard annealing temperatures tested and transferability to *S. macrocephala* and *S. macrocephala* cv. Pioneiro. †Indicate the temperature of successful DNA amplification.

Loci	Size range (bp)	Tested temperatures for <i>S. capitata</i> (°C)								Transferability to <i>S. macrocephala</i>			<i>S. Macrocephala</i> cv. Pioneiro [‡]
		55	56	57	58	59	60	61	62	Reported	This work [‡]	Temperature Tested/amplified [†]	
SC 18-01 B3 ^a	222-225	/	+	/	-	/	-	/	/	-	-	56 [†] ,60	-
SC 18-01 C7B ^a	318-330	/	+	/	-	/	-	/	/	+ ^a	+	56 [†] ,58,60	+
SC 18-01 E11 ^a	235-239	/	+	/	/	/	-	/	/	-	-	56,60	-
SC 18-01T F11A ^a	188-186	/	-	/	-	/	+	/	/	-	-	56,58,60	-
SC 18-01 G4B ^a	250-255	-	+	/	/	/	-	/	/	+ ^a	+	56 [†]	+
SC 18-01 A2A ^b	232-238	/	/	/	/	/	+	/	/	+	-	60 [†]	-
SC 18-01 B4 ^b	238-242	/	-	-	-	/	-	/	-	-	-	55,56	-
SC 18-01 E4 ^b	300-310	/	/	/	/	/	+	/	/	+	+	60 [†]	+
SC 18-02 E12 ^b	270-305	/	-	/	+*	/	+	/	-	+	+	58,60 [†]	+
SC 18-01T F2 ^b	196-198	/	/	/	/	/	+	/	/	-	-	60	-
SC 18-01T G9 ^b	242-245	/	/	/	/	/	+	/	/	+	+ ^a	60 [†]	+ ^a
SC 18-01T G12A ^b	240-260	/	-	/	-	+	-	/	-	-	-	59	-
SC 18-02 H1 ^b	204-218	/	/	/	+*	+*	+	-	-	+	-	58 [†] ,59 [†] ,60 [†] ,61,62	-
SC 18-01T H4 ^b	182-195	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	55,57	-
SC 18-01 H5 ^b	192-196	+	/	/	/	/	-	/	/	-	-	55,60	-

+ = amplified; +* = amplified with lower efficiency; ^asome samples amplify and others do not; - = not amplify; / = not tested; [†]For transferability, four plants were tested; ^aSantos et al. (2009a); ^bSantos et al. (2011).

Statistical Analyses

The statistical analyses were similar to those fully described by Moraes Filho et al. (2015) for ISSR and SSR molecular markers. The GenAlex 6.5 software (Peakall and Smouse, 2012) was used to generate the genetic distance matrix according to Nei (1972) and calculate genetic diversity parameters and genetic differentiation between populations (AMOVA, F_{ST}) (Excoffier et al., 1992; Weir and Cockerham, 1984). The differences between means were performed with One-way ANOVA, followed by post-hoc Tukey (significance level 0.05), using Excel tools and the PAST Software (Hammer et al., 2001). The software MEGA 5 (Tamura et al., 2011) was used to generate a dendrogram of genetic dissimilarity based on the UPGMA algorithm. The software Structure 2.0 (Pritchard et al., 2000) was used to investigate the genetic structure of samples from a cluster analysis based on models.

Results

Standardization and selection of molecular markers

Nine ISSR markers (UBC 1, 2, 834, 851, 860, 862, 864, 885, 886) of 15 markers tested (Table 1) showed amplification products in *S. capitata* and *S. macrocephala*. Except for ISSR 1, the remaining eight markers were used to perform the genetic analysis of both species (Table 1 and Table 3).

From the fifteen SSR markers developed for *S. capitata*, annealing temperatures previously described (60°) for seven primers were confirmed and temperatures for the other six were standardized (Tables 1 and 2) (Santos et al., 2009a; Santos et al., 2011). We did not obtain amplification products with SSR SC18-01T H4 and SC18-01

Table 3 – Parameters of genetic diversity for *S. capitata* and *S. macrocephala* species with molecular markers ISSR. A = number of alleles observed; Ae = effective number of alleles [$1 / (p^2 + q^2)$]; He = Nei genetic diversity [$2 * p * q$]; PL=number of polymorphic loci; %P = percentage of polymorphic loci; SE = standard error.

	ISSR	A	Ae	He	PL	%P
<i>S. capitata</i>	UBC-2	1.71	1.40	0.284	18.00	85.70
	UBC-834	2.00	1.39	0.246	09.00	100.00
	UBC-851	2.00	1.58	0.338	13.00	100.00
	UBC-860	1.90	1.61	0.344	10.00	90.00
	UBC-862	2.00	1.80	0.428	11.00	100.00
	UBC-864	1.50	1.47	0.283	12.00	75.00
	UBC-885	1.87	1.28	0.191	14.00	87.50
	UBC-886	1.95	1.45	0.275	19.00	95.00
Mean		1.84	1.49	0.292	13.25	91.65 %
SE		0.05	0.03	0.016	-	3.14
<i>S. macrocephala</i>	UBC-2	2.00	1.59	0.323	21.00	100.00
	UBC-834	1.77	1.43	0.256	08.00	89.00
	UBC-851	1.85	1.52	0.301	12.00	92.31
	UBC-860	2.00	1.54	0.312	10.00	100.00
	UBC-862	1.82	1.75	0.392	10.00	90.91
	UBC-864	1.63	1.48	0.270	12.00	75.00
	UBC-885	1.94	1.32	0.211	15.00	93.75
	UBC-886	1.90	1.40	0.245	18.00	90.00
Mean		1.87	1.50	0.285	13.25	91.36 %
SE		0.04	0.03	0.017	-	2.78

B4 primers in our laboratory conditions after testing with seven and five temperatures, respectively (Table 2). Moreover, cross-transferability of five SSR markers to *S. macrocephala* was confirmed (Santos et al., 2009a; 2011), using related and new annealing temperatures (Table 2).

Although SC18-01T G9 presents less reliable results in *S. macrocephala*, as it amplifies some samples and not others, this primer should be used with caution (Table 2). SSR molecular markers SC18-02 E12, SC18-01 E4, SC18-01 G4B, and SC18-01 C7B, which amplified both species, were selected for the genetic characterization proposed.

Genetic structure

The cluster (Figures 1A and B) and the ancestry analysis (ISSR α = 0.050/SSR α = 0.036) (Figures 1C and D), with the two type of molecular markers, suggest that populations of both species are divided into two genetic groups, agreeing with the identification of individuals for each species. According to the STRUCTURE analysis, the "purest" sample was *S. capitata*, with 97 % of its genetic composition assigned to a single genetic cluster. The *S. macrocephala* sample showed more considerable genetic mixture with 95 % attributed to its principal ancestral group.

The joint analysis of both markers showed four contaminants in both groups analyzed, three (4 %) in the species *S. macrocephala* (M2, M11, and M12) and one (1 %) in the species *S. capitata* (C10.13) (Figures 1A, B, C and D), which were removed for subsequent analyses. However, it is essential to highlight that this data was

obtained after the removal of 117 contaminants in the field; therefore, it does not correspond the real *S. capitata* seed lot purity.

The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that most genetic variability was found among species, and the ISSR analysis indicated a higher value (Φ_{ST} = 23.09) than the SSR markers (Φ_{ST} = 3.15) (Table 4). The F_{ST} values showed differentiation (SSR- F_{ST} = 0.366 ± 0.061) and a small number of historical gene flow (SSR- N_m = 0.509 ± 0.155) between *S. capitata* and *S. macrocephala* species.

Table 4 – Molecular Analysis of Variance (AMOVA) ($p < 0.05$). Df = Degrees of freedom; SS = Sum of Squares; EV = Estimated Variance; %V = Percentage of variance.

	Df	SS	EV	%V
ISSR Markers				
Between Species Φ_{st}	1	1812.23	23.09	67 %
Within Species Φ_{ct}	154	1754.01	11.39	33 %
Total	155	3566.24	34.48	100 %
SSR Markers				
Between Species Φ_{st}	1	247.61	3.15	60 %
Within Species Φ_{ct}	154	321.30	2.09	40 %
Total	155	568.91	5.24	100 %

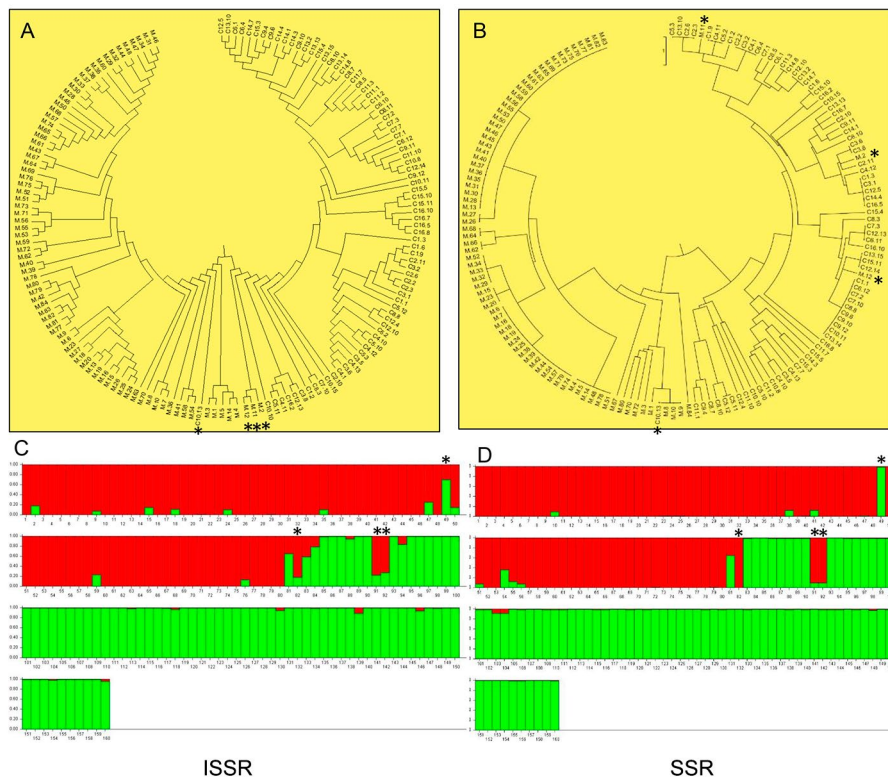


Figure 1 – Above (A, B): UPGMA dendrogram, demonstrating the genetic relationships among species *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala* with ISSR/SSR markers. Below (C, D): Relationship of ancestry for the genetic cluster of individuals of the species *S. capitata* (red) and *S. macrocephala* (green), respectively. Both species samples were grouped into two major clusters. See the contaminant individuals (*) 49 (C10.13) of *S. capitata* and individuals M2 (82), M11(91) and M12 (93) of *S. macrocephala*, respectively.

Diversity genetic analysis

The eight selected ISSR primers generated 116 loci, with an average of 14.5 loci per primer, ranging from nine (UBC-834) to 21 (UBC-2). The average percentage of polymorphism of *S. capitata* ($M = 92\%$) was similar to *S. macrocephala* ($M = 92\%$) (Table 3). No differences were observed for parameters A (Number of different alleles), A_e (Number of effective alleles) and H_e (expected heterozygosity) between populations of both species ($H_{e_{sc}} = 0.292 \pm 0.016$; $H_{e_{sm}} = 0.285 \pm 0.017$). Markers UBC 2, 864, 885 and 886 formed specific haplotypes of each species, including samples from *S. macrocephala* cv. Pioneiro, although the first two amplified higher quality fingerprints (Figures 2A and B).

The four SSR markers were polymorphic and generated 19 alleles (A) for *S. capitata* with an average of 4.75 ± 1.11 , ranging from two (SC18-01 G4B) to seven (SC18-02 E12) (Table 5). For *S. macrocephala*, ten alleles were amplified, a smaller number than for *S. capitata*, with an average of 2.50 ± 0.87 , ranging from one (SC18-01 G4B, monomorphic) to five (SC18-01 E4) (Table 5). *S. capitata* exhibited higher average values of H_e than *S. macrocephala* ($H_{e_{sc}} = 0.57 \pm 0.09$ / $H_{e_{sm}} = 0.16 \pm 0.14$). Lower values of F were observed in *S. capitata* (-0.06 ± 0.41), while the highest values were found in *S. mac-*

rocephala (0.42 ± 0.26), for which F was positive and different from zero, indicating heterozygote deficiency, possibly due to the presence of monomorphic loci. In this sense, the lower diversity of *S. macrocephala* must be viewed with caution since the SSR markers used were transferred from *S. capitata*, which can present reduced polymorphism, as discussed by Guidugli et al. (2010). Nonetheless, Santos et al. (2012) reported similar inter-relationships and results in 192 *S. capitata* ($H_e = 0.50$) and 134 *S. macrocephala* ($H_e = 0.36$) accessions, considering that the SSR markers used for the analysis of *S. macrocephala* were developed for the species (Santos et al., 2009b). Therefore, our diversity data are consistent with data previously published (Santos et al., 2009a; 2009b; 2012). According to the repeatability and quality, SC18-01 G4B is the most reliable SSR species-specific marker, amplifying simultaneously monomorphic alleles of different sizes by both species (Figure 2C).

DNA analysis of contaminant plants in the field

The fingerprint analysis of molecular markers ISSR UBC-864 and SSR SC18-01 G4B showed that contaminant plants discarded in the field belong to species *S. macrocephala* (Figures 2B and C), endorsing contamination of *S. capitata* commercial seeds used in the ex-

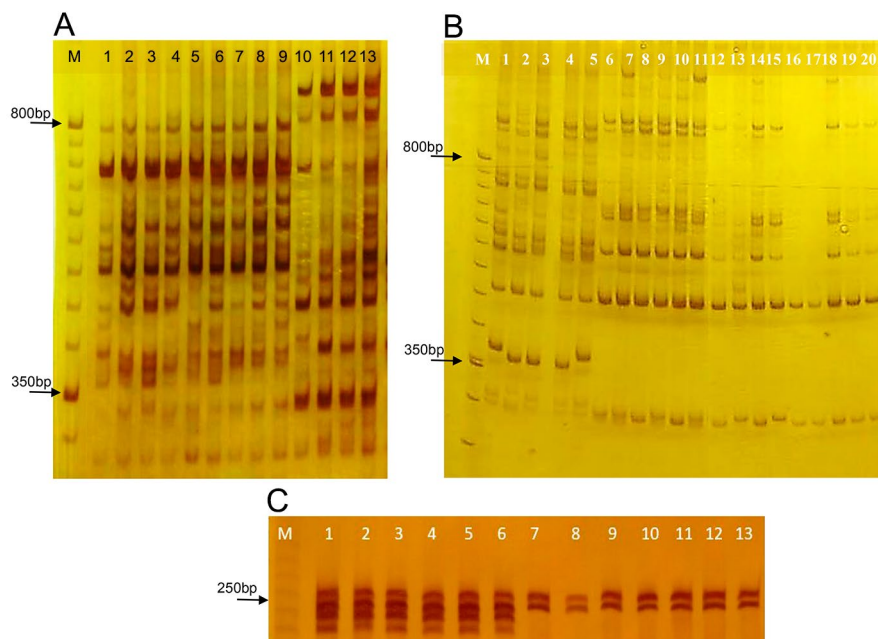


Figure 2 – Diagnostic fingerprints of *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala* species generated by the amplification of ISSR markers UBC-2 (A) and UBC-864 (B), and SSR SC18-01 G4B (C) in polyacrylamide gel 8 % non-denaturing (ISSR) and denaturing (SSR). A) Channels 1-4, 5-9 and 10-13 correspond to DNA amplification of the control samples of *S. macrocephala*, *S. macrocephala* cv. Pioneiro and *S. capitata*, respectively. B) Channels 1-5, 6-11 and 12-20 correspond to DNA amplification of the control samples of *S. capitata*, *S. macrocephala*, and some contaminant individuals observed in the field, respectively. C) Channels 1-6, 7-9, 10-11 and 12-13 correspond to DNA amplification of control samples of *S. capitata*, *S. macrocephala*, two contaminant individuals observed in the field and *S. macrocephala* cv. Pioneiro, respectively. M is the molecular weight marker (50bp/ISSR, 10pb/SSR/Invitrogen). According to (B) and (C), contaminating plants in the field belong to *S. macrocephala*.

periment. Some plants of *S. macrocephala* survived in the field and some differences were observed on their morphological characteristics regarding *S. capitata* when adults, such as smaller and narrower leaflets, hairiness, more branched and thin stems, more spaced trifoliate leaves, smaller flowers with brown nectar-guides (Figures 3A and B). However, according to Cook et al. (2005), brown nectar-guides are also observed in *S. fruticosa*, *S. guianensis*, *S. hamata*, *S. humilis*, *S. scabra*, *S. seabrana* and *S. viscosa* thus this morphological character must be used carefully as a phenotypic marker.

Discussion

In species of genus *Stylosanthes*, without a list of stable descriptors available for morphological characterization (Maass and Sawkins, 2004), molecular markers such as RAPDs, RFLPs, AFLPs, ITS, SSRs, SRAPs, and ISSRs can improve knowledge about germplasm and accessions deposited in collections, aiming their use in breed-

ing programs (Santos et al., 2009a; 2009b; 2012; Vieira et al., 1997; Liu et al., 1999; Sawkins et al., 2001; Vander Stappen et al., 2002; Huang et al., 2014; Nagaich and Chandra, 2009). The ISSR markers are advantageous because the same primer may produce, simultaneously, distinctive fingerprints of different species (Zietkiewicz et al., 1994; Godwin et al., 1997; Sepúlveda-Nieto et al., 2017), as observed in *Stylosanthes hamata* (Nagaich and Chandra, 2009) and in this work. This type of molecular markers can be used efficiently for identification of genotypes, protection of intellectual property rights, and genetic purity analyses (Zietkiewicz et al., 1994; Rakoczy-Trojanowska and Bolibok, 2004; Kumar and Sharma, 2011). This economic strategy allows to confirm the identification of samples, avoiding wasting time with poorly classified materials that may falsely increase levels of genetic diversity within species, as observed by Santos et al. (2012) in studies with Germplasm Bank accessions of *S. capitata*. However, for microevolutionary purposes, microsatellite markers stand out as the most suitable for

Table 5 – Genetic diversity across *S. capitata* and *S. macrocephala* samples analyzed using simple sequence repeat (SSR) markers. N = Number of individuals, A = Number of alleles; Ae = Effective number of alleles; H_o = Observed heterozygosity; H_e = Expected heterozygosity; F = Fixation index; ClF = Jackknife confidence intervals for the fixation index; N, A, Ae, H_o , H_e and F are reported as means (SE = standard error).

Species	Loci	N	A	Ae	H_o	H_e	F	ClF
<i>S. capitata</i>	SC18-02 E12	77	7.00	4.14	0.21	0.76	0.73	
	SC18-01 E4	74	4.00	1.59	0.18	0.37	0.52	
	SC18-01 G4B	79	2.00	2.00	1.00	0.50	-1.00	
	SC18-01 C7B	78	6.00	2.93	0.99	0.66	-0.50	
Mean		77.00	4.75	2.66	0.59	0.57*	-0.06	-0.26 - 0.08
SE		1.08	1.11	0.57	0.23	0.09	0.41	-
<i>S. macrocephala</i>	SC18-02 E12	76	2.00	1.01	0.01	0.013	-0.01	
	SC18-01 E4	66	5.00	2.38	0.18	0.579	0.69	
	SC18-01 G4B	76	1.00	1.00	0.00	0.000	1.00	
	SC18-01 C7B	69	2.00	1.03	0.03	0.029	-0.02	
Mean		71.75	2.50	1.36	0.06	0.16*	0.42	0.22 - 0.56
SE		2.53	0.87	0.34	0.04	0.14	0.26	-

* $p \leq 0.05$.



Figure 3 – Leaves, flowers and inflorescences of adult plants of the species *Stylosanthes capitata* (A) and *Stylosanthes macrocephala* (B) observed in the Trop-T-FACE experiment.

crossing systems, gene flow and paternity studies, for their codominance of the alleles, easy detection via PCR, and high allelic diversity (Oliveira et al., 2006; Avise, 2004; Vieira et al., 2016). The synteny among related species allows SSR cross-transferability, and that the success depends on the phylogenetic distance (Zhu et al., 2005; Vieira et al., 2016).

In this work, we characterized the first time eight ISSR markers that can be used simultaneously in the genetic study of *S. capitata* and *S. macrocephala*, four of them amplifying fingerprints characteristics that can aid in characterization and identification of germplasm. Similarly, we finely characterized 15 previously developed SSR markers, with a gradient of annealing temperatures (Table 2) and verified their cross-transferability to *S. macrocephala* and *S. macrocephala* cv. Pioneiro. Also, for the first time, heterologous SSR markers SC18-02 E12, SC18-01 E4, SC18-01 G4B, SC18-01 C7B (Santos et al., 2009a; 2011) were genetically characterized in *S. macrocephala* (Table 5) and primer SC18-01 G4B was identified as the most reliable species-specific marker, amplifying simultaneously monomorphic alleles of different sizes in each species sample and identifying directly contaminant samples. Although *S. macrocephala* was a possible diploid ancestor of *S. capitata* (Maass and Sawkins, 2004), both species display a clear separation, as shown by the cluster, ancestry and genetic structure analyses (AMOVA and F_{ST}). Regarding diversity, the analysis with SSR markers shows higher values for *S. capitata*. In general, the two sets of molecular markers grouped samples of both species similarly and highlighted their genetic similarities and differences and the contamination cases in the samples.

The species-specific bands ISSR/SSR identified between both species are useful for the analysis of genetic purity, mainly because the mixture of both species comprise the cultivar "Estilosantes Campo-grande", currently the most important Brazilian forage legume. As the *Stylosanthes* genus has considerable agronomic, agroforestry and silvopastoral importance, both as a protein source and for soil conservation, accurate identification of this species is essential for further improvement of cultivars and transference of desirable features from wild species to domesticated ones (Gillies and Abbott, 1998; Cameron and Chakraborty, 2004). The integration of knowledge of diversity patterns, geographic information (Costa and Shultze-Kraft, 1990; Barros et al., 2005; Maass and Sawkins, 2004) and physiology (Martinez et al., 2014) allows understanding suitable ecological conditions for conservation of this species in nature as well as its most appropriate use, aiming at genetic improvement to reduce impacts of climate change in the future.

Acknowledgements

This work was financed by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Thematic Project (Grant 2008/58075-8), and Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant 446357/2015-4) to C.A.M., and FAPESP (Grant 2015/23930-9) to A.L.A.M. We also acknowledge the support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Programa de Excelência Acadêmica (CAPES-PROEX) grants. C.C.S. was supported by IC (2014/24817-9) and TTIII FAPESP (2016/21182-8), fellowships, respectively. F.B.A. was supported by a TTIII FAPESP fellowship (2013/18633). L.G.S. and R.M.M.F. were supported by an MSc and the Programa Nacional de Pós Doutorado (PNPD) Fellowship from CAPES, respectively. P.M.S.R. was supported by DSc CNPq fellowship (140144/2016-1). A.L.A.M (PDS 150737/2014-9) and C.A.M. were supported by fellow's research from CNPq. The authors thank the help of Dra. Marcela Corbo Guidugli. The authors thank the commercial company seeds that gave us the seeds of *S. capitata* and *S. macrocephala* and Dr. Allan K.B. Ramos of Embrapa Cerrados for providing the seeds of *S. macrocephala* cv. Pioneiro.

Authors' Contributions

Conceptualization: Alzate-Marin, A.L.; Martinez, C.A. Data acquisition: Costa-Silva, C.; Rivas, P.M.S.; Santos, L.G.; Bonifacio-Anacleto, F. Data analysis: Moraes, R.M.; Costa-Silva, C.; Rivas, P.M.S.; Santos, L.G.; Bonifacio-Anacleto, F. Design of Methodology: Alzate-Marin, A.L. Writing and editing: Alzate-Marin, A.L.; Costa-Silva, C.; Rivas, P.M.S.; Moraes, R.M.; Martinez, C.A.

References

- Alzate-Marin, A.L.; Guidugli, M.; Soriani, H.H.; Martinez, C.A.H.; Mestriner, M.A. 2009. An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 1217-1224.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers: Natural History and Evolution*. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- Azani, N.; Babineau, M.; Bailey C.D.; Banks, H.; Barbosa, A.R.; Pinto, R.B. 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66: 44-77.
- Barros, A.M.; Faleiro, F.G.; Karia, C.T.; Shiratsuchi, L.S.; Andrade, R.P.; Lopes, G.K.B. 2005. Genetic and ecological variability of *Stylosanthes macrocephala* determined by RAPD markers and GIS. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 899-909 (in Portuguese, with abstract in English).
- Cameron D.F.; Chakraborty, S. 2004. Forage potential of *Stylosanthes* in different production systems. p. 27-38. In: Chakraborty, S., ed. *High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems*. CSIRO, Canberra, Australia.
- Cook, B.G.; Pengelly, B.C.; Brown, S.D.; Donnelly, J.L.; Eagles, D.A.; Franco, M.A.; Hanson, J.; Mullen, B.F.; Partridge, I.J.; Peters, M.; Schultze-Kraft, R. 2005. Tropical forages: an interactive selection tool; *Stylosanthes capitata*, *Stylosanthes macrocephala*. CSIRO, Canberra, Australia. Available at: <http://www.tropicalforages.info> [Accessed July 24, 2018]

- Costa, L.C.; Valls, J.F.M. 2015. *Stylosanthes* in List of Species of Flora of Brazil. Botanical Garden of Rio de Janeiro = *Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29854> [Accessed July 24, 2018] (in Portuguese).
- Costa, N.M.S.; Shultze-Kraft, R. 1990. Biogeography of *Stylosanthes Capitata* Vog. and *Stylosanthes Gulanensis* Sw. VAR. *Pauciflora*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 25: 1547-1554 (in Portuguese, with abstract in English).
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [Embrapa]. 2000. *Estilosantes Campo Grande: establishment, management and animal production = Estilosantes Campo Grande: estabelecimento, manejo e produção animal*. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brazil. (Comunicado Técnico, 61). Available at: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/323701/estilosantes-campo-grande-estabelecimento-manejo-e-producao-animal> [Accessed July 25, 2018] (in Portuguese).
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Gillies, A.C.M.; Abbott, R.J. 1998. Evaluation of random amplified polymorphic DNA for species identification and phylogenetic analysis in *Stylosanthes* (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* 211: 201-216.
- Godwin, I.D.; Aitken, E.A.B.; Smith, L.W. 1997. Application of inter simple sequence repeats (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18: 1524-1528.
- Grof, B.; Schultze-Kraft, R.; Muller, F. 1979. *Stylosanthes capitata* Vog., some agronomic attributes, and resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.). *Tropical Grasslands* 13: 28-37.
- Guidugli, M.C.; Accoroni, K.A.; Mestriner, M.A.; Contel, E.P.; Martinez, C.A.; Alzate-Marin, A.L. 2010. Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). *Genetics and Molecular Biology* 33: 131-134.
- Hammer, O.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4: 9. Available at: https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf [Accessed July 12, 2018]
- Huang, C.Q.; Liu, G.D.; Bai, C.J.; Wang, W.Q.; Tang, J. 2014. Application of SRAP markers in the identification of *Stylosanthes guianensis* hybrids. *Molecular Biology Reports* 41: 5923-9.
- Jank, L.; Valle, C.B.; Resende, R.M.S. 2011. Breeding tropical forages. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* S1: 27-34.
- Kumar, V.; Sharma, S.N. 2011. Comparative potential of phenotypic, ISSR and SSR markers for characterization of sesame (*Sesamum indicum* L.) varieties from India. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 14: 163-171.
- Liu, C.J.; Musial, J.M.; Thomas, B.D. 1999. Genetic relationships among *Stylosanthes* species revealed by RFLP and STS analyses. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 1179-1186.
- Maass, B.L.; Sawkins, M. 2004. History, relationships and diversity among *Stylosanthes* species of commercial significance. p. 9-26. In: Chakraborty, S., ed. *High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems*. CSIRO, Canberra, Australia.
- Mannetje, L.T. 1984. Considerations on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. p. 1-23. In: Stace, H.M.; Edey, L.A., eds. *The biology and agronomy of *Stylosanthes**, Academic Press, New York, NY, USA.
- Martinez, C.A.; Bianconi, M.; Silva, L.; Approbato, A.; Lemos, M.; Santos, L.; Curtarelli, L.; Rodrigues, A.; Mello, T.; Manchon, F. 2014. Moderate warming increases PSII performance, antioxidant scavenging systems and biomass production in *Stylosanthes capitata* Vogel. *Environmental and Experimental Botany* 102: 58-67.
- Miles, J.W.; Lascano, C.E. 1997. Status of *Stylosanthes* development in other countries. I. *Stylosanthes* development and utilisation in South America. *Tropical Grasslands* 31: 454-459.
- Moraes Filho, R.M.; Bonifacio-Anacleto, F.; Alzate-Marin, A.L. 2015. Fragmentation effects and genetic diversity of the key semideciduous forest species *Metrodorea nigra* in southwestern Brazil. *Genetics and Molecular Research* 14: 3509-3524.
- Nagaich, D.; Chandra, A. 2009. Assessment of genetic diversity and identification of informative molecular markers for germplasm characterization in Caribbean stylo (*Stylosanthes hamata*). *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology* 18: 257-260.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-292.
- Oliveira, A.F.; Pádua, J.G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky, R.; Vieira, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.
- Peakall, R.; Smouse, P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rakoczy-Trojanowska, M.; Bolibok, H. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular and Molecular Biology Letters* 9: 221-238.
- Roskov, Y.; Zarucchi, J.; Novoselova, M.; Bisby, F. 2018. ILDIS World Database of Legumes (version 12, May 2014). In: Roskov, Y.; Abucay, L.; Orrell, T.; Nicolson, D. *Species 2000 & ITIS Catalogue of life*. Naturalis, Leiden, The Netherlands. Available at: www.catalogueoflife.org/col [Accessed July 25, 2018]
- Sanguinetti, C.J.; Dias, E.N.; Simpson, A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 914-921.
- Santos, M.O.; Sasaki, R.P.; Chiari, L.; Resende, R.M.S.; Souza, A.P. 2009a. Isolation and characterization of microsatellite loci in tropical forage *Stylosanthes capitata* Vogel. *Molecular Ecology Resources* 9: 192-194.
- Santos, M.O.; Sasaki, R.P.; Ferreira, T.H.S.; Resende, R.M.S.; Chiari, L.; Karina, C.T.; Faleiro, F.G.; Jungmann, L.; Zucchi, M.I.; Souza, A.P. 2009b. Polymorphic microsatellite loci for *Stylosanthes macrocephala* Ferr. et Costa, a tropical forage legume. *Conservation Genetic Resources* 1: 481-485.

- Santos, M.O.; Resende, R.M.S.; Chiari, L.; Zucchi, M.I.; Souza, A.P. 2011. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Euphytica* 178: 185-193.
- Santos, M.O.; Toledo-Silva, G.; Sasaki, R.P.; Ferreira, T.H.; Resende, R.M.S.; Chiari, L.; Karia, C.T.; Carvalho, M.A.; Faleiro, F.G.; Zucchi, M.I.; Souza, A.P. 2012. Using genetic diversity information to establish core collections of *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*. *Genetics and Molecular Biology* 35: 847-861.
- Sawkins, M.C.; Maass, B.L.; Pengelly, C.; Newbury, H.J.; Ford-Lloyd, B.V.; Maxted, N.; Smith, R. 2001. Geographical patterns of genetic variation in two species of *Stylosanthes* Sw. using amplified fragment length polymorphism. *Molecular Ecology*: 1947-1958.
- Sepúlveda-Nieto, M.D.P.; Bonifacio-Anacleto, F.; Figueiredo, C.F.; Moraes-Filho, R.M.; Alzate-Marin, A.L. 2017. Accessible morphological and genetic markers for identification of taioba and taro, two forgotten human foods. *Horticulturae* 3: 49.
- Stappen, J.V.; Laet, J.; Gama-López, S.; van Campenhout, S.; Volckaert, G. 2002. Phylogenetic analysis of *Stylosanthes* (Fabaceae) based on the internal transcribed spacer region (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematics and Evolution* 234: 27-51.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Vieira, M.L.C.; Fungaro, M.H.P.; Jubier, M.F.; Lejeune, B. 1997. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw., *Leguminosae*, using RAPD markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32: 305-310.
- Vieira, M.L.C.; Santini, L.; Diniz, A.L.; Munhoz, C.F. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39: 312-328.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution* 38: 1358- 1370.
- Zhu, H.; Choi, H-K.; Cook, D.R.; Shoemaker, R.C. 2005. Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiology* 137: 1189-1196.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Artigo 2 (Submetido): Crossing rates resilience of tropical forage legume
Stylosanthes capitata (Vogel) under warming and elevated CO₂ in a
simulated climate change scenario

Priscila Marlys Sá Rivas, Fernando Bonifácio-Anacleto, Carlos Alberto Martinez y Huaman,
Ana Lilia Alzate-Marin

Euphytica (International Journal of Plant Breeding)
Impact factor: 1.54

Euphytica

Crossing rates resilience of tropical forage legume *Stylosanthes capitata* (Vogel) under warming and elevated CO₂ in a simulated climate change scenario

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	EUPH-D-19-00694	
Full Title:	Crossing rates resilience of tropical forage legume <i>Stylosanthes capitata</i> (Vogel) under warming and elevated CO ₂ in a simulated climate change scenario	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	climate changes; mixed mating system; microsatellite markers; tropical forages.	
Corresponding Author:	Ana Lilia Alzate Marin, DS Universidade de São Paulo - USP Ribeirão Preto, São Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade de São Paulo - USP	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Priscila Marlys Sá Rivas	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Priscila Marlys Sá Rivas	
	Carolina Costa-Silva	
	Carlos Alberto Martinez	
	Ana Lilia Alzate-Marin, DSc	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	FAPESP (08/58075-8)	DSc Carlos Alberto Martinez
	FAPESP (15/23930-9)	Professor Ana Lilia Alzate-Marin
	CNPq (446357/2015-4)	DSc Carlos Alberto Martinez
	CNPq (140144/2016-1)	MSc Priscila Marlys Sá Rivas
	CNPq (150737/2014-9)	Professor Ana Lilia Alzate-Marin
	CNPq (306039/2016-8)	DSc Carlos Alberto Martinez
	FAPESP (2014/24817-9)	BSc Carolina Costa-Silva
	FAPESP (2016/21182-8)	BSc Carolina Costa-Silva
Abstract:	In climate change scenarios is crucial the estimation of genetic parameters of economically important plant species aiming to predict their responsiveness and adaptability. In this work, we evaluated the effects of warming (+2 °C) and atmospheric CO ₂ increase (to 600 ppm) on genetic diversity and crossing rates of <i>Stylosanthes capitata</i> Vogel, a Brazilian native tropical legume, important for tropical livestock production. We submitted plants to four treatments: Control (C), an increase of atmospheric CO ₂ concentration by 600 ppm (eCO ₂), warming +2°C (eT), and their interaction (eCO ₂ +eT) in an open field experiment, using a simulation climate change facility named Trop-T-FACE. We extracted DNA from foliar tissues of ten adult plants per treatment and their offspring (germinated in vitro) and amplified it with seven polymorphic microsatellites. We tested the significant differences between treatments by Factorial Variance Analysis (Two Factors) (p<0.05). We observed that most genetic	

	<p>diversity and fixation indexes were similar among generations and treatments. However, expected heterozygosity was reduced on eT warming plots ($p < 0.05$), suggesting an increase in homozygotes in these populations. Treatments on parental plants did not influence multilocus outcrossing rates of <i>S. capitata</i> (C=48.9%, eC=54.4%, eT=60.8%, eCO2+eT=47.1%, $p > 0.05$), showing resilience in their mixed crossing system in the experimental conditions studied. Pollinator behavior, the number of flowers per plant promoting autogamy, as well as possible degeneration of pollen grains in warming treatments, could contribute to the observed results. This research presents innovative results useful for orientating strategies for germplasm preservation and breeding of <i>S. capitata</i>.</p>
<p>Suggested Reviewers:</p>	<p>Maria Imaculada Zucchi, Dr Professor, Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegocios mizucchi@apta.sp.gov.br Specialist in the conservation of plant genetic resources</p> <p>Luciana Rossi Pinto, Dra. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Ribeirão Preto lurossini@iac.sp.gov.br Specialist in the conservation of plant genetic resources</p> <p>Alison Goncalves Nazareno, Dr. Professor, Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciencias Biologicas alison_nazareno@yahoo.com.br Specialist in the conservation of plant genetic resources</p> <p>Bianca Waléria Bertoni, Dra. Professor, Universidade de Ribeirao Preto bbertoni@unaerp.br Specialist in the conservation of plant genetic resources</p> <p>Miguel Luiz Menezes Freitas Universidade de Sao Paulo Instituto de Energia e Ambiente miguellmfreitas@yahoo.com.br Specialist in the conservation of plant genetic resources</p>

[Click here to view linked References](#)

1 **Crossing rates resilience of tropical forage legume *Stylosanthes capitata* (Vogel)**
2 **under warming and elevated CO₂ in a simulated climate change scenario**

3

4 Priscila Marlys Sá Rivas^{1,2}, Carolina Costa-Silva¹, Carlos Alberto Martinez³, Ana Lilia Alzate-Marin^{1,2*}

5

6 ¹Laboratory of Plant Genetics, Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, The University of
7 São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

8 ²Graduate Program in Genetics, Ribeirão Preto Medical School, The University of São Paulo, Av.
9 Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

10 ³Plant Physiology Laboratory, Department of Biology, FFCLRP, The University of São Paulo, Av.
11 Bandeirantes 3900, 14049-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

12

13 *Corresponding author: Ana Lilia Alzate-Marin.

14 Address: Laboratory of Plant Genetics, Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, The
15 University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil, Phone: +55 16
16 33153356; e-mail: anaalzate@fmrp.usp.br

17

18 **ORCID**

19 Priscila Marlys Sá Rivas, <http://orcid.org/0000-0002-6429-1607>

20

21 Carolina Costa-Silva, <http://orcid.org/0000-0002-1315-416X>

22

23 Carlos Alberto Martinez, <http://orcid.org/0000-0002-0246-9481>

24

25 Ana Lilia Alzate-Marin, <http://orcid.org/0000-0003-3389-7048>

26

27

28 **Acknowledgements**

29 This study was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) Thematic Project
30 (Grant 08/58075-8) and CNPq/ANA/MCTI (Grant 446357/2015-4) to C.A.M. and FAPESP Research
31 Fellowship (Grant 15/23930-9) to A.L.A.M. P.M.S.R. was supported by a Doctoral fellowship from
32 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant 140144/2016-1).
33 C.C.S. was supported by IC (2014/24817-9) and TTIII (2016/21182-8) FAPESP fellowships. C.A.M. was
34 supported by a CNPq fellowship (Grant 306039/2016-8). A.L.A.M was also supported by a Senior Post-
35 Doctoral fellowship from CNPq (Process 150737/2014-9).

36 The authors thank EMBRAPA-Gado de Corte and SAFRASUL-*Sementes* for providing
37 *Stylosanthes capitata* seeds. The authors thank Dr. Bruce Kimball and Prof. Franco Miglietta for their
38 support in the design and installation of the Trop-T-FACE facility.

39

40 Abstract

41 In climate change scenarios is crucial the estimation of genetic parameters of economically
42 important plant species aiming to predict their responsiveness and adaptability. In this work, we evaluated
43 the effects of warming (+2 °C) and atmospheric CO₂ increase (to 600 ppm) on genetic diversity and
44 crossing rates of *Stylosanthes capitata* Vogel, a Brazilian native tropical legume, important for tropical
45 livestock production. We submitted plants to four treatments: Control (C), an increase of atmospheric
46 CO₂ concentration by 600 ppm (eCO₂), warming +2°C (eT), and their interaction (eCO₂+eT) in an open
47 field experiment, using a simulation climate change facility named Trop-T-FACE. We extracted DNA
48 from foliar tissues of ten adult plants per treatment and their offspring (germinated in vitro) and amplified
49 it with seven polymorphic microsatellites. We tested the significant differences between treatments by
50 Factorial Variance Analysis (Two Factors) ($p < 0.05$). We observed that most genetic diversity and fixation
51 indexes were similar among generations and treatments. However, expected heterozygosity was reduced
52 on eT warming plots ($p < 0.05$), suggesting an increase in homozygotes in these populations. Treatments
53 on parental plants did not influence multilocus outcrossing rates of *S. capitata* (C=48.9%, eC=54.4%,
54 eT=60.8%, eCO₂+eT=47.1%, $p > 0.05$), showing resilience in their mixed crossing system in the
55 experimental conditions studied. Pollinator behavior, the number of flowers per plant promoting
56 autogamy, as well as possible degeneration of pollen grains in warming treatments, could contribute to
57 the observed results. This research presents innovative results useful for orientating strategies for
58 germplasm preservation and breeding of *S. capitata*.

59

60 **Keywords:** climate changes, mixed mating system, microsatellite markers, tropical forages.

61

62 Introduction

63 Climate change mitigation is one of the major concerns of the scientific community. In the past
64 four years, global temperature levels peaked, as reported by NASA's National Oceanic and Atmospheric
65 Administration (NOAA 2019). Projections estimate that global temperature will rise up to 2°C until 2050,
66 depending on the anthropogenic greenhouse gas emissions scenario (IPCC 2007; 2013). CO₂ atmospheric
67 concentration will probably exceed 600 ppm by 2050, reaching 1000 ppm by the end of this century
68 (Long et al. 2004; IPCC 2013; 2014). Imminent climate change will probably increase the occurrence of
69 unprecedented extreme events in several parts of the planet, threatening species and ecosystem diversity,
70 richness, as well as economic and social human capital (Beniston and Stephenson 2004). Food security is
71 another central issue related to climate change since temperature and rainfall patterns will profoundly
72 affect the agro-livestock industry impacting, among others, supply, storage quality and cultural practices
73 (FAO 2008). It was reported that agricultural productivity in the tropics would significantly decrease due
74 to both a decline in rainfall frequency and an increase in the mean temperature (Adams et al. 1998;
75 Marengo et al. 2009; Lawrence and Vandecar 2015).

76 Plants present high complexity in their crossing systems since they have no influence over the
77 external environmental factors to which they are exposed (Holsinger 1996). High-temperature extremes
78 will become more frequent, due to expected climate changes. When warmer days coincide with the most

79 sensitive phases of plant development, such as the flowering, dramatic reduction in seed production could
80 occur due to the interruption of the pollination process (Wheeler and Reynolds 2013). Pollination services
81 are indispensable for the functioning of ecosystems and essential for crop-associated biodiversity in agro-
82 ecosystems and support the health and resilience of crop populations (Abrol et al. 2012). The presence of
83 natural or semi-natural pollinators in agro-ecosystems is responsible for increased diversity, productivity,
84 and yield of cultivated species (Klein et al. 2007). The disruption or increase of these interactions may
85 cause physiological and phenological changes of plants with cascading effects on ecological and
86 agricultural systems (Fitter and Fitter 2002; Eckert et al. 2010). Phenological shifts that result in temporal
87 or spatial mismatches between plants and pollinators may affect their demography and consequently
88 crossbreeding systems, inbreeding degrees, as well as seed dispersal and plant recruitment, leading loss of
89 genetic diversity of populations disturbing food security (FAO 2008, Fitter and Fitter 2002; Hegland et al.
90 2009; Eckert et al. 2010, Abrol et al. 2012). Breeding systems determine gene transmission to the
91 following generations, molding the genetic composition of a population that is available for natural
92 selection (Brown et al. 1990). However, only a few research has been developed to evaluate the effects of
93 altering abiotic factors (such as expected on climatic changes) on the reproductive traits of economically
94 important crop species (Ansaldi et al. 2018a), especially in the tropics.

95 Brazil is one of the top three countries leading global meat production (OECD/FAO 2015). In
96 Brazil, about 90% of cattle are pasture-fed only (Oliveira-Silva et al. 2017). Therefore, climatic changes
97 affecting crop pastures species will have a significant impact on Brazilian livestock production and,
98 consequently, on the world bovine meat supply (Thomas 1995; Humphreys 1994). The legume species
99 *Stylosanthes capitata* (Vogel) stands out as a source of nutrients for livestock due to its great adaptation to
100 acid soils and resistance to desiccation, which guarantees high-quality forage even under abiotic stress
101 (Grof et al. 1979). Previous studies of our group (unpublished data) showed that induced-warming and its
102 interactions with elevated carbon concentrations led to an increase in floral visitors and floral abundance.
103 Therefore, our questions are if these phenological and insect-behavior changes will alter parameters of
104 genetic diversity, inbreeding, and crossing rates of offspring of tropical legume *S. capitata* grown up in
105 these environments. We hypothesize that the offspring produced under warming and elevated CO₂ would
106 have higher levels of genetic diversity, lower inbreeding rates, and higher crossing rates when compared
107 to ambient conditions.

108 In this study, we examined the genetic diversity and crossing rates of offspring derived of plants
109 of *S. capitata* grown by effects of warming (+ 2 °C) and elevated [CO₂] ~600 ppm, under field conditions
110 in a Trop-T-FACE facility composed by a Temperature free-air controlled enhancement system (T-
111 FACE), and a Free-air carbon dioxide enrichment (FACE) system.

112

113 **Material and Methods**

114 *Study species*

115 *Stylosanthes capitata* Vogel (Fabaceae, Papilionoideae) is a tropical legume forage species native
116 of Brazil and adapted to moist environments and acidic soils from tropics (Costa and Schultze-Kraft
117 1990; Costa et al. 2008; Fortuna-Perez et al. 2011; Costa and Valls 2015). The species is a subshrub with

118 a strong and deep roots system that reaches 50-120 cm of height. It presents typical keel flowers of
119 Fabaceae, in terminal inflorescence structures (Figure 1). The flowers of this species are small (1 cm),
120 heterostilic, formed by five petals with a yellow corolla (8.5 to 14.5 mm in length), with bi-ovulated
121 ovaries (Costa 2006; Tozzi 2016). In tropics, the flowering of *S. capitata* usually begins at the end of the
122 rain season (May) and fruiting in June, commonly, around 9 to 12 weeks after the first flower anthesis
123 (De Castro et al. 1994; Machado et al. 2010). *S. capitata* is an allotetraploid species ($2n = 40$), probably
124 originated from the hybridization between *S. macrocephala* and *S. pilosa* (Battistin and Martins 1987; Liu
125 et al. 1999). It presents a mixed crossing system, with a predominance of self-pollination, observing
126 crossing rates between 7 and 47.7% (Miles 1983; Santos-Garcia et al. 2011). The species is pollinated
127 mainly by Exomalopsis, Trigona, and Megachile bees (Miles 1983).

128 *S. capitata* is a high protein and nutritional forage that mixed with the species *Stylosanthes*
129 *macrocephala* (80:20%, respectively) compose the cultivar "Estilosantes Campo Grande", one of the
130 most legume used as forage for a consortium with grasses in Brazilian pastures (Embrapa Gado de Corte
131 2007; Jank et al. 2014). *S. capitata* is highly resistant to anthracnose and to dry soil, easily adapted to low
132 fertility soils due to its ability to fix nitrogen, since its roots associate with *Rhizobium sp.* bacteria (Grof et
133 al. 1979; Embrapa Gado de Corte 2007).

134

135 *Experimental area and Trop-T-FACE system*

136 We sowed *S. capitata* seeds in the open-field Trop-T-FACE facility installed in the University of
137 São Paulo campus (21°10'08.4"S, 47°51'50.6"W), in the city of Ribeirão Preto - São Paulo, Southeastern
138 of Brazil (Figure 2a,b). The climate of the region is tropical humid, with rainy summers and other dry
139 seasons (Kotchetkoff-Henriques 2003).

140 The treatments (4 replicates each) applied before and during the flowering period in sixteen 2-m
141 diameter plots, were: 1) C = Control environment (ambient temperature and ambient CO₂), 2) eCO₂ =
142 elevated CO₂ concentrations (600 ppm), 3) eT = elevated temperature (increase of + 2 °C in the
143 temperature than Control plots), and 4) eCO₂ + eT = Interaction of elevated temperature and elevated
144 CO₂.

145 The warming system (T-FACE) of Trop-T-FACE allowed the temperature of the heated plots to be
146 kept at +2 ° C above of the Control plots (Kimball et al. 2008) and consisted of the following
147 components: a central controller and data storage unit, eight distribution units and power controller in the
148 experimental plots each with a dimmer for automatic voltage adjustment (Kalglo, USA), 6 FTE-750-240
149 Ceramic Infrared Heating Element (Mor Electric, USA) Salamander Ceramic Infrared Heaters, installed
150 inside Salamander ALEX aluminum reflectors (Mor Electric, USA), infrared thermometers, power supply
151 and computer for data storage (Figure 2d-f). Throughout the experimental period, the average canopy
152 temperature was 19.03, 19.30, 21.04, and 21.30 °C in the Control, eCO₂, eT, and eCO₂+eT plots,
153 respectively. The temperature difference between eCO₂ and Control was 0.27 °C, and between eT and
154 Control was 2.01 °C, proving the excellent performance of the heating system. The difference in
155 temperature observed between eCO₂ and Control treatments may be related to reduced leaf transpiration
156 because stomatal closure of leaves induced by high CO₂, as verified by Haberman et al. (2019).

157 The miniFACE system was a modification of the pure POPFACE CO₂ fumigation described by
158 Miglietta et al. (2001). Two-meter diameter PVC rings with perforated micro-holes surrounded each plot
159 through which CO₂ was released into the plant canopy. In the center of each plot was located a GMT222
160 CO₂ sensor (Vaisala, Helsinki, Finland) and used to evaluate [CO₂]. A central controller unit regulated the
161 amount of CO₂ required to raise [CO₂] to the 600 ppm setpoint. A 12-ton cryogenic tank with liquid CO₂
162 (-180 °C) and a vaporizer unit provided the gaseous CO₂. Dummy PVC rings without holes were also
163 placed in Control plots. The daily average [CO₂] in the environmental plots [CO₂] was 395 ± 15 ppm,
164 while FACE fumigation increased the daytime average [CO₂] to 595 ± 20 ppm in the e CO₂ and eCO₂ +
165 eT plots during the experiment. CO₂ fumigation did not occur at night. However, the nocturnal average
166 [CO₂] was 455 ± 19 ppm due to heterotrophic respiration of the plant and soil.

167

168 *Sampling, DNA extraction, and SSR amplification*

169 We sampled foliar tissues from ten maternal plants per treatment and collected the seeds of each
170 plant at the end life cycle (July-August 2015). We germinated in vitro the seeds, sampled the foliar tissues
171 of 16 offspring per family (Figure 2c), and stored them at -20°C together with the sample of each mother.
172 Posteriorly, we extracted the DNA according to Alzate-Marin et al. (2009) and quantified on NanoDrop
173 Spectrophotometer (ThermoScientific). Previously we standardized the annealing temperatures for the
174 SSR markers set (Alzate-Marin et al. 2019) described by Santos-Garcia et al. (2011), and we selected
175 seven primer-pairs for amplification of *S. capitata* populations (Table 1).

176 We performed the DNA amplification in a MasterCycle apparatus - (Eppendorf®). Each reaction
177 (13 µl) contained 2 µl of genomic DNA (10ug / µl), 5 µl of GoTaq Colorless Master Mix, 5 µl of
178 Nuclease-FreeWater (Promega) (Taq DNA polymerase supplied in reaction buffer [pH 8.5] 2x colorless,
179 400µL, dATP, 400µL dGTP, 400µL dCTP, 400µL dTTP and 3mM MgCl₂) and 1 µl of each primer
180 (SSR). The PCR program for amplification was one cycle at 94 °C for 5 minutes, 30 cycles at 94 °C for 1
181 minute, annealing temperatures at 55-60 °C for 1 minute, 72 °C for 1 minute, one extension cycle a 72
182 °C for 7 minutes.

183 Amplicons of each mother and their offspring were separated on a GelBot® automated capillary
184 electrophoresis system (Loccus-BioOptic Inc.) using a high-resolution cartridge capable of separating
185 fragments from two to 1000 bp. For allele size analysis, we used the Q-Analyzer software (BioOptic Inc.),
186 which compares peak amplification with system standard peaks (20pb and 1000pb) and calculates the
187 amplified sample allele number. A size range was delimited, which would correspond to the same allele,
188 based on the observation of the peaks of matrices and offspring.

189 *Genetic diversity and genetic differentiation of populations*

190 Genetic diversity of the populations from different treatments was analyzed comparing the
191 parameters: the number of alleles per locus (A), the number of the effective alleles per locus (Ae), and the
192 observed and expected heterozygosity (Ho, He) according to the proportions of the Hardy-Weinberg
193 equilibrium. The fixation index (F) was estimated to evaluate inbreeding in the populations, using the
194 permutation method (1000 replicates). We assessed the parameters with the GenAlex 6.5 (Peakall and

195 Smouse 2012). We also estimated the genetic differentiation between subpopulations with GDA software
196 (Lewis and Zaykin 2000), estimating Nei's Genetic distance (1972) in pairwise comparisons of each
197 treatment.

198

199 *Mating System*

200 We assess the mating system by mixed models (Ritland and Jain 1981; Ritland 2002) and
201 correlated crosses (Ritland 1989) using the MLTR program (Ritland 2004). We estimate the parameters:
202 multilocus crossover rates (tm), single-locus outcrossing rate (ts), Mating rate among relatives (tm-ts),
203 and the correlation of selfing among families (rs). We estimated the standard error of the parameters by
204 1000 bootstrap resamples for the total population. The general methodology of these analyses was similar
205 to that performed by Santos-Garcia et al. (2011).

206

207 *Statistical Analyses*

208 We verified data normality by the Shapiro-Wilk test, considering $p < 0.05$, and tested the effect of
209 the treatments by the Factorial Variance Analysis (Two Factors). The first factor was CO₂ elevation
210 (eCO₂), and the second factor was temperature elevation (eT), each having two levels (absence/presence
211 of eCO₂, absence/presence of eT). We expressed the results as mean, followed by SE (standard error). We
212 performed the analyses with GraphPad Prism v.8 for Windows (San Diego, California, USA) and Excel
213 analysis tools.

214

215 **Results**

216 *Genetic diversity parameters*

217 The Factorial Variance Analysis showed that there was no significant effect of treatments on the
218 parameters: the number of alleles (A), the effective number of alleles (Ae) and observed heterozygosity
219 (Ho), as summarized in Table 2. However, there was a significant effect of the temperature elevation
220 factor over the expected heterozygosity parameter (*** $p < 0.001$, Table 2).

221 Offspring of all treatments (Table 2) showed a similar total number of alleles ($M_A = 6.2 \pm 0.22$), the
222 effective number of alleles ($M_{Ae} = 3.7 \pm 0.34$), and observed heterozygosity ($M_{Ho} = 0.30 \pm 0.01$). Offspring
223 from eT treatments had significantly lower expected heterozygosity (0.61 ± 0.51) than the other treatments
224 (Control [0.76 ± 0.02], eCO₂ [0.71 ± 0.03] and eCO₂+eT [0.68 ± 0.03] (Table 2). Overall, the observed
225 heterozygosity was lower than the expected heterozygosity, suggesting that in the sampled population,
226 there is a higher proportion of homozygotes than in a population that fits the Hardy-Weinberg equilibrium
227 model (Table 1).

228 Mean fixation indices were high, positive, and different of zero in all experimental groups and
229 statistically similar among treatments and generations (Adults $M_{Fis} = 0.50 \pm 0.07$; offspring $M_{Fis} = 0.57 \pm 0.02$)
230 suggesting inbreeding in all populations.

231 Genetic differentiation of populations

232 The genetic divergence matrix between adults and offsprings populations through the analysis of
233 Fst statistics are summarized in Table 3. Fisher's exact test showed significant differences between
234 offspring populations in the mean of Fst per treatment (**p<0.001, Table 3). Offspring derived from
235 warmed plots (eT) presented the largest genetic differences with values among 10.8%, 10.6% and 8.70%
236 from eCO₂, Controle and eCO₂+eT, respectively. In turn, offspring from eCO₂ treatment presented the
237 lowest genetic differences differing 4.5% and 5.30% from Control and eCO₂+eT treatment (Table 3). The
238 offspring from eCO₂+eT treatments differed 7.00% from those grown in the Control environment.

239 Mating system

240 The Factorial Variance Analysis test showed that there was no significant effect of treatments on
241 the parameters multilocus outcrossing rate (tm, M_{tm}=0.53±0.03), single-locus outcrossing rate (ts,
242 M_{ts}=0.26±0.02), mating among relatives (tm-ts, M_{tm-ts}=0.27±0.02) and the correlation of selfing among
243 families (rs, M_{rs}=0.39±0.07). Statistical values for these parameters are shown in Table 4. The offspring
244 of the different treatments show proportions of cross-fertilization (53.00%) and self-fertilization
245 (47.00%), corroborating the mixed reproduction system of *S. capitata* species. Mating between related
246 individuals occurred in ~ 27.00% of all treatments (Table 4). The parameter (rs) indicates that there was
247 ~39.00% offspring result of correlated selfing events (Table 4).

248

249 Discussion

250 In this research, we present data that aim to answer the questions about the effects of the increase of
251 atmospheric air temperature (+ 2 °C) and CO₂ concentration (600 ppm) on the levels of genetic diversity,
252 inbreeding and crossing rates of tropical legume *S. capitata*. Differently from what was expected in our
253 initial hypothesis, our data indicate that all of the reproductive effort invested by *S. capitata* plants from
254 warming treatments (eT and eCO₂+eT): increase in the number of flowers, higher production of seeds per
255 inflorescence, and increased foraging of bees (unpublished data) resulted in progeny with similar
256 magnitude of genetic variability, similar levels of inbreeding between the generations and similar crossing
257 rates than Control environment. Increase of warming and CO₂ seem not affecting *Stylosanthes capitata*
258 genetic parameters (at least on the first generation analyzed on these four future climate scenarios), which
259 would be in agreement with other evidences that shown that many plants species will undergo to
260 compensatory adjustments to maintain population performance and not necessarily be impaired on
261 predicted climatic changes (Maclean et al. 2011).

262 The resilient *S. capitata* crossing rates observed in our research (Tm=0.53 ± 0.03) are similar to those
263 previously reported for the species, which range from 6 to 48% (Miles 1983: 12.00 - 48.00%; Santos et al.
264 2011: 7.00 – 31.00%), characterizing *S. capitata* as mixed crossing species and showing that our data are
265 consistent. A mixed-mating system could be understood as reproductive assurance in plants, being that
266 this plasticity would protect plants from climate disturbance (Eckert et al. 2006; Jones et al. 2013; Ansaldi
267 et al. 2018b).

268 Our results evidence a significant reduction in the diversity value (He) and higher genetic
269 distances of offspring derived from eT treatment when compared with the other treatments. Genetic
270 diversity of plants is directly related to the species mating system since it is the principal cause of genetic
271 variation within the populations (Henry 2005). Depending on bee's species and foraging behavior, self-
272 pollination or cross-pollination can be favored. In *Stylosanthes* sp., effective pollination is driven by the
273 keel mechanism (Ramalho and Rosa 2010), which could increase cross-pollination. Bees tend to favor
274 foraging and pollination in warmer flowers, even if cold flowers present the same nutritional reward
275 (Dyer et al. 2006). These flowers are most attractive since bees expend less energy on thermogenic
276 regulation of body temperature, required for flight during foraging (Rands and Whitney 2008), whereby
277 thermal rewarding is a key clue for bee attraction. However, as observed in the field, the increase of
278 flowers in the same plants in the eT treatments (unpublished data) may have modified the flight distances
279 between pollinators favoring autogamy. In this sense, our results show that ~ 27.00% of matings occurred
280 among the relatives and that ~39.00% of offspring result of correlated selfing events which may be a
281 consequence of selfing produced by the movement of a pollinator within flowers (Takebayashi et al.
282 2006). These results consolidate the observed fixation Index, which was significant and positive (Table
283 2). In plants with hermaphrodite flowers, like *S. capitata*, mating among relatives is another source of
284 inbreeding (Gonela et al. 2013, Turchetto et al. (2015). Our results are in accordance with that climate
285 change could be one of the leading causes of genetic diversity loss in plant ecosystems, affecting
286 community composition, species interactions, ecosystem dynamics, and structure (Henry 2005; Jarvis et
287 al. 2008).

288 Overall, our results reveal a resiliency to warming and CO₂ elevation perturbation by *S. capitata*
289 mixed-mating species, at least in this first generation, possibly determined by compensatory responses of
290 pollen viability and seed production, as observed by Jones et al. (2013) in *Viola*
291 *praemorsa* spp. *praemorsa*. Due to its capacity to resist to dry and poor quality soils, and to produce good
292 quality forage, *S. capitata* is considered an appropriate species for breeding programs (Oliveira et al.
293 2016). For that reason, more information about mating systems, reproductive output, and germination are
294 necessary to elucidate the intergenerational effects of future climate change on important tropical species
295 (Marty and BassiriRad 2014).

296 Therefore, mating-system findings of *S. capitata* allow us to infer that expected climatic changes will
297 not threaten this native leguminous; however, it is necessary to understand physiological changes that
298 would affect forage quality, to conclude better about future utilization of this forage for agro-industry
299 purposes. Instead, we also highlight the ecological importance of native legumes on the recovery of poor
300 soils and restoration of degraded areas. It is also important to the point that our purpose was to study the
301 crossing rates in future ambient conditions, but experiments were realized with the availability of actual
302 natural pollinators. Therefore, the extrapolation of our data to future climate scenarios must be done with
303 caution. Regardless of these observations, data presented here are inédited and offer a possible path to
304 understand future alterations in this important native tropical species.

305
306
307

308 **References**

- 309 Abrol DP (2011) Climate change and pollinators. In: Abrol DP (ed) Pollination biology: biodiversity
310 conservation and agricultural production. 1st edn Springer Netherlands, pp 479-508
- 311 Adams RM, Hurd BH, Lenhart S, Leary N (1998) Effects of global climate change on agriculture: an
312 interpretative review. CR 11:19-30. doi:10.3354/cr011019
- 313 Alzate-Marin AL, Guidugli MC, Soriani HH, Martinez CA, Mestriner MA (2009) An efficient and rapid
314 DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree
315 species. Brazilian Archives of Biology and Technology 52:1217-1224.
316 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000500020>
- 317 Alzate-Marin AL, Silva CC, Rivas PMS, Bonifácio-Anacleto F, Santos LG Moraes-Filho R, Martinez
318 CAH (2019) Diagnostic fingerprints ISSR/SSR for tropical leguminous species *Stylosanthes*
319 *capitata* and *Stylosanthes macrocephala*. Scientia Agricola 77: e20180252.
320 <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0252>
- 321 Ansaldi BH, Franks SJ, Weber JJ (2018a) The influence of environmental factors on breeding system
322 allocation at large spatial scales. AoB Plants 10:ply069. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply069>
- 323 Ansaldi BH, Weber JJ, Franks SJ (2018b) The role of phenotypic plasticity and pollination environment
324 in the cleistogamous, mixed mating breeding system of *Triodanis perfoliata*. Plant Biology
325 20:1068–1074. <https://doi.org/10.1111/plb.12877>
- 326 Beniston M, Stephenson DB (2004) Extreme climatic events and their evolution under changing climatic
327 conditions. Global Planet change 44: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2004.06.001>
- 328 Brown AHD (1990) Genetic characterization of plant mating systems. In: Brown AHD, Clegg MT,
329 Kahler AL, Weir BS (eds) Plant population genetics, breeding, and genetic resources, Sinauer
330 Associates. Sunderland pp 145-162
- 331 Costa LC, Valls JFM (2015) *Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio
332 de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29860>. Accessed November 2019
- 333 Costa LC, Sartori ALB, Pott A (2008) Estudo taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae –
334 Papilionoideae – Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. Rodriguésia 59:547-572.
335 <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860200859310>
- 336 Costa NMS (2006) Revisão do Gênero de *Stylosanthes* Sw. Tese de Doutorado. Universidade Técnica de
337 Lisboa Instituto Superior de Agronomia
- 338 Costa NMS, Schultze-kraft R (1990) Biogeografia de *Stylosanthes capitata* Vog. e *S. guianensis* Sw. var.
339 *pauciflora*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 25:1547-1554
- 340 Cruz CD (2001) Programa GENES - versão windows. Aplicativo computacional em Genética e
341 Estatística. 1. ed. v. 1. Editora UFV Viçosa, MG. http://arquivo.ufv.br/dbg/genes/genes_Br.htm.
342 Accessed 10 November 2019

343 De Castro CRT, Alvarenga EMA, Silva RF, Reis FP, Reis MS (1994) Armazenamento e vigor de
344 sementes de *Stylosanthes capitata* Vog. Rev Ceres 41:67-80

345 Dyer AG, Whitney HM, Arnold SE, Glover BJ, Chittka L (2006) Behavioural ecology: bees associate
346 warmth with floral colour. Nature 442:525. doi: 10.1038/442525a

347 Eckert CG, Kalisz S, Geber MA, Sargent R, Elle E, Cheptou PO, Goodwillie C, Johnston MO, Kelly JK,
348 Moeller DA, Porcher E (2010) Plant mating systems in a changing world. Trends Ecol Evol 25:35-
349 43. doi: 10.1016/j.tree.2009.06.013

350 Eckert CG, Samis KE, Dart S (2006) Reproductive assurance and the evolution of uniparental
351 reproduction in flowering plants. In: Harder LD, Barrest SCH (eds) Ecology and evolution of
352 flowers. Oxford University press, pp 183:203

353 Embrapa gado de Corte (2007) Cultivo e uso do Estilosantes-campo-grande. Comunicado Técnico 105.
354 Embrapa Gado de Corte Campo Grande, MS.
355 <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPGC/12108/1/Cot105.pdf>.

356 FAO (2008) Climate change and food security: A framework document.
357 <http://www.fao.org/3/k2595e/k2595e00.pdf>. Accessed 10 November 2019

358 OECD/FAO (2015) Perspectivas Agrícolas 2015. OECD Publishing, Paris.
359 https://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-es

360 Fitter AH, Fitter RS (2002) Rapid change in flowering time in british plants. Science 296:1689-1691.
361 doi:10.1126/science.1071617

362 Fortuna-Perez AP, Silva MJ, Tozzi MGA (2011) *Stylosanthes* (Leguminosae –Papilionoideae–Dalbergiae)
363 no estado de São Paulo, Brasil. Rodriguésia 62:615-628. [http://dx.doi.org/10.1590/2175-
364 7860201162310](http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201162310)

365 Gonela A, Sebbenn AM, Soriani HH, Mestriner MA, Martinez CA, Alzate-Marin AL (2013) Genetic
366 diversity and mating system of *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae/Caesalpinioideae). Genet Mol
367 Res 12:569-80. doi:10.4238/2013.February.27.6

368 Grof B, Schultze-Kraft R, Muller F (1979) *Stylosanthes capitata* Vog., some agronomic attributes, and
369 resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.). Tropical Grasslands 13:28–37

370 Habermann E, Dias de Oliveira EA, Contin DR, San Martin JAB, Curtarelli L, Gonzalez-Meler MA,
371 Martinez CA (2019) Stomatal Development and Conductance of a Tropical Forage Legume Are
372 Regulated by Elevated [CO₂] Under Moderate Warming. Front. Plant Sci. 10:609. doi:
373 10.3389/fpls.2019.00609

374 Hegland SJ, Nielsen A, Lázaro A, Bjerknes AL and Totland Ø (2009) How does climate warming affect
375 plant-pollinator interactions?. Ecol 12:184-195. doi: [10.1111/j.1461-0248.2008.01269.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01269.x)

376 Henry RJ (2005) Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants.
377 CABI Publishing, Wallingford, UK

378 Holsinger KE (1996) Pollination biology and the evolution of mating systems in flowering plants. *Journal*
379 *of Evolutionary Biology* 29:107–149

380 Humphreys LR (1994) *Tropical forages: their role in sustainable agriculture*. Longman Scientific and
381 Technical, Harlow (UK)

382 IPCC (2007) *Climate Change: Mitigation of Climate Change*. Working Group III contribution to the
383 Intergovernmental Panel on Climate Change. Fourth Assessment Report, Geneva

384 IPCC (2013) *Climate Change: The physical science basis*. The Twelfth Session of Working Group I
385 (WGI-12) contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change. Fifth Assessment
386 Report, Stockholm, Sweden

387 IPCC (2014) *Climate Change: Mitigation of Climate Change*. Synthesis Report. Contribution of Working
388 Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate
389 Change Working. Geneva

390 Jank L, Barrios S C, do Valle C B, Simeão R M, Alves G F (2014) The value of improved pastures to
391 Brazilian beef production. *Crop Pasture Sci* 65:1132-1137. <https://doi.org/10.1071/CP13319>

392 Jarvis A, Lane A and Hijmans RJ (2008) The effect of climate change on crop wild relatives. *Agr Ecosyst*
393 *Environ* 126:13-23. doi:10.1016/j.agee.2008.01.013

394 Jones NT, Husband BC and MacDougall AS (2013) Reproductive system of a mixed-mating plant
395 responds to climate perturbation by increased selfing. *Proc Biol Sci* 280:20131336.
396 doi: [10.1098/rspb.2013.1336](https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1336)

397 Kimball BA, Conley MM, Wang S, Lin X, Luo C, Morgan J, Smith D (2008) Infrared heater arrays for
398 warming ecosystem field plots. *Global Change Biol* 14:309-320. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01486.x)
399 [2486.2007.01486.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01486.x)

400 Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C and Tscharntke T
401 (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B* 274: 303–
402 313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>

403 Kotchetkoff-Henriques O (2003) *Characterization of the Natural Vegetation in Ribeirão Preto, SP: Bases*
404 *for Conservation*. DSc thesis, University of São Paulo

405 Lawrence D, Vandecar K (2015) Effects of tropical deforestation on climate and agriculture. *Nat Clim*
406 *Change* 5:27–36

407 Lewis PO, Zaykin D (2000) *GDA—Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT*.
408 <https://phylogeny.uconn.edu/software/>. Accessed 10 November 2019

409 Liu CJ, Musial JM and Thomas BD (1999) Genetic relationships among *Stylosanthes* species revealed by
410 RFLP and STS analyses. *TAG* 99:1179-1186

411 Long SP, Ainsworth EA, Rogers A and Ort DR (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE
412 the future. *Annu Rev Plant Biol* 55:591-628. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141610

413 Marengo JA, Jones R, Alves LM and Valverde MC (2009) Future change of temperature and
414 precipitation extremes in South America as derived from the PRECIS regional climate modeling
415 system. *Int J Climatol* 29:2241-2255. <https://doi.org/10.1002/joc.1863>

416 Machado LA, Lempp B, do Valle CB, Jank L, Batista LAR, Postiglioni S R, Resende RMS, Fernandes
417 CD, Verzignassi JR, Valentim JF, Assis GML de, Andrade CMS (2010) Principais espécies
418 forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. In: Pires AV (ed) *Bovinocultura de corte*,
419 Fealq, Piracicaba, pp 375-417

420 Maclean IM, Wilson RJ (2011) Recent ecological responses to climate change support predictions of high
421 extinction risk. *PNAS* 108:12337-12342. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017352108>

422 Battistin A., Martins PS (1987) Chromosome number of seven species and three varieties of the genus
423 *Stylosanthes* sw leguminosae papilionoideae. *Revista Brasileira de Genética* 10:599-602

424 Marty C and BassiriRad H (2014) Seed germination and rising atmospheric CO₂ concentration: a meta-
425 analysis of parental and direct effects. *New phytol* 202:401-414. <https://doi.org/10.1111/nph.12691>

426 Miglietta F, Peressotti A, Vaccari F, Zaldei A, DeAngaelis P, Scarascia-mugnozza G, Cascine P (2001)
427 Free-air CO₂ enrichment (FACE) of a poplar plantation: the POPFACE fumigation system. *New*
428 *Phytol* 150:465–476. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00115.x>

429 Miles JW (1983) Natural outcrossing in *Stylosanthes capitata*. *Tropical Grassland* 17: 114-117

430 NOAA -National Oceanic and Atmospheric Administration (2019) 2018 Fourth Warmest Year in
431 Continued Warming Trend, According to NASA, NOAA. [https://www.nasa.gov/press-](https://www.nasa.gov/press-release/2018-fourth-warmest-year-in-continued-warming-trend-according-to-nasa-noaa)
432 [release/2018-fourth-warmest-year-in-continued-warming-trend-according-to-nasa-noaa](https://www.nasa.gov/press-release/2018-fourth-warmest-year-in-continued-warming-trend-according-to-nasa-noaa). Accessed
433 10 November 2019

434 Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am Nat* 106(949) 283-292.
435 <https://doi.org/10.1086/282771>

436 Oliveira-Silva R, Barioni LG, Hall JJ, Moretti AC, Veloso RF, Alexander P, Crespolini M, Moran D
437 (2017) Sustainable intensification of Brazilian livestock production through optimized pasture
438 restoration. *Agr syst* 153:201-211. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.02.001>

439 Oliveira RSD, Queiróz MAD, Romao RL, Silva GCD and Brasileiro BP (2016) Genetic diversity in
440 accessions of *Stylosanthes* spp. using morphoagronomic descriptors. *Rev Caatinga* 29:101-112.
441 <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n112rc>

442 Peakall ROD, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software
443 for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288-295. [https://doi.org/10.1111/j.1471-](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x)
444 [8286.2005.01155.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x)

445 Ramalho M, Rosa JF (2010) Ecologia da interação entre as pequenas flores de quilha de *Stylosanthes*
446 *viscosa* Sw.(Faboideae) e as grandes abelhas *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) cearensis Ducke, 1910
447 (Apoidea, Hymenoptera), em duna tropical. *Biota Neotropica* 10:93–100.
448 <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000300010>

- 449 Rands SA, Whitney HM (2008) Floral temperature and optimal foraging: is heat a feasible floral reward
450 for pollinators?. PLoS One 3:e2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002007>
- 451 Ritland K (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci.
452 Heredity 88:221-228. doi:10.1038/sj.hdy.6800029
- 453 Ritland K, Jain S (1981) A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n
454 independent loci. Heredity 47:35-52. doi: 0018-067X/81/03150035\$02.00
- 455 Ritland K (1989) Correlated-matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. Evolution 43: 848–859.
456 <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb05182.x>
- 457 Ritland K (2004) Multilocus mating system program MLTR. Version 3.1. University of British
458 Columbia. <http://kermizii.com/software/>. Accessed 10 November 2019
- 459 Santos-Garcia MO, Resende RMS, Chiari L, Zucchi MI, de Souza AP (2011) Mating systems in tropical
460 forages: *Stylosanthes capitata* Vog. and *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Euphytica 178:185-
461 193. doi: 10.1007/s10681-010-0293-x
- 462 Takebayashi N, Wolf DE, Delph LF (2006) Effect of variation in herkogamy on outcrossing within a
463 population of *Gilia achilleifolia*. Heredity 96:159-65. doi: 10.1038/sj.hdy.6800780
- 464 Thomas RJ (1995) Role of legumes in providing N for sustainable tropical pasture systems. In:
465 Ladha JK, Peoples MB (eds) Management of Biological Nitrogen Fixation for the
466 Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems. Developments in
467 Plant and Soil Sciences, vol 65. Springer Dordrecht, pp103-118
- 468 Tozzi AMGA (2016) Papilionoideae In: Tozzi AMGA, Melhem TS, Forero E, Fortuna-Perez AP,
469 Wanderley MGL, Martins SE, Romanini RP, Pirani JR, Fiuza de Melo MMR, Kirizawa M, Yano
470 O, Cordeiro I (eds) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo,
471 vol 8, pp 167-397
- 472 Turchetto C, Lima JS, Rodrigues DM, Bonatto SL, Freitas LB (2015) Pollen dispersal and breeding
473 structure in a hawkmoth-pollinated Pampa grasslands species *Petunia axillaris* (Solanaceae). Ann
474 Bot 115:939-948. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv025>
- 475 Wheeler T, Reynolds C (2013) Predicting the risks from climate change to forage and crop production for
476 animal feed. Animal front 3:36-41. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0006>

477 **Figure Captions**

478 **Figure 1.** Morphological structures of *Stylosanthes capitata* Vogel species. Trifoliate foliar structures,
479 and hairy bracts inflorescences and yellow corolla flowers (Credit: Plant Genetic Laboratory - USP-RP).

480 **Figure 2.** Scheme of the Trop-T-FACE experiment (a). Open field location (b). Experimental plots
481 cultivated with *Stylosanthes capitata* (c). Components of Trop-T-FACE facility: IR-heating lamp (d),
482 Canopy temperature sensors (e) and CO₂ sensor (f) in the plots. (Credit: Plant Genetic Laboratory - USP
483 -RP).



Figure 1

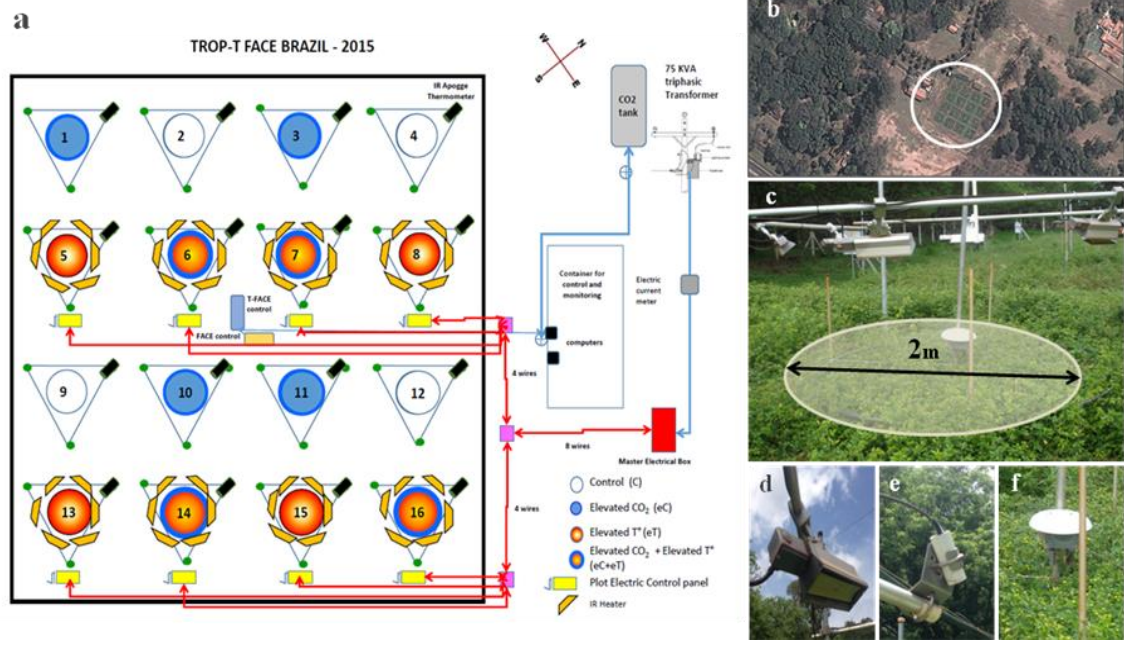


Figure 2

Table 1. Seven microsatellite *loci* used for *S. capitata* mating system analysis, developed by Santos et al. (2011) and standardized by Alzate-Marin et al. (2019).

Loci	Forward and Reverse Primers Sequence	Fragment length (bp)
SC 18-01 A2A	5' AGCAGCATAGGGAATAAAAT 3' 5' CAAAGGCCTAATCAACTGTG 3'	232-238
SC 18-01 F2	5' CTGACCCACCTAATGAGAAA 3' 5' AGCAAAACAAAACAAACAACACTA 3'	196-198
SC 18-01 E12	5' TGGAGACAACACCCTTATG 3' 5' ATTCTATTACTCTTGCCTTTTCT 3'	270-305
SC 18-01 E4	5' CGGCAACTGGGAAAAATAA 3' 5' ATGGGTAATCACAAATCTTCAG 3'	300-310
SC 18-01T G9	5' TCCAGCTAAAGGGCAACACA 3' 5' CCACCGCACACCAGAGATT 3'	242-245
SC 18-01T G12A	5' ATGCTGATTTTTGGCTCTTTT 3' 5' CCCCTTTTGAACGGATTG 3'	240-260
SC 18-01 H5	5' GCATCATTTGCATTTGTTTT 3' 5' CTATCACCTCTCCATACCTTATC 3'	192-196

Table 2. Genetic diversity parameters for *S. capitata* treatments followed by results of Factorial ANOVA. Values expressed as mean, followed by standard error. Legend: A: number of alleles, Ae: number of effective alleles, Ho: observed heterozygosity, He: expected heterozygosity, FIS: Fixation Index.

<i>A</i>			
Factors	Mean \pm SE	Value F-ANOVA	% of variation
C	6.57 \pm 0.61	-	-
eCO ₂	6.43 \pm 0.80	F = 0.15; <i>p</i> = 0.69	0.25
eT	5.57 \pm 0.90	F = 0.59; <i>p</i> = 0.44	0.97
eCO ₂ + eT	6.29 \pm 0.61	F = 0.34; <i>p</i> = 0.56	0.55
Overall mean	6.20 \pm 0.22		

<i>Ae</i>			
Factors	Mean \pm SE	Value F-ANOVA	% of variation
C	4.60 \pm 0.73	-	-
eCO ₂	3.91 \pm 0.63	F = 0.04; <i>p</i> = 0.84	0.01
eT	2.99 \pm 0.57	F = 2.90; <i>p</i> = 0.09	0.47
eCO ₂ + eT	3.43 \pm 0.50	F = 0.85; <i>p</i> = 0.36	0.14
Overall mean	3.70 \pm 0.34		

<i>Ho</i>			
Factors	Mean \pm SE	Value F-ANOVA	% of variation
C	0.30 \pm 0.12	-	-
eCO ₂	0.35 \pm 0.13	F = 0.09; <i>p</i> = 0.77	0.01
eT	0.28 \pm 0.12	F = 0.09; <i>p</i> = 0.77	0.01
eCO ₂ +eT	0.30 \pm 0.10	F = 0.02; <i>p</i> = 0.90	0.02
Overall mean	0.30 \pm 0.01		

<i>He</i>			
Factors	Mean \pm SE	Value F-ANOVA	% of variation
C	0.76 \pm 0.02	-	-
eCO ₂	0.71 \pm 0.03	F = 0.08; <i>p</i> = 0.77	0.14
eT	0.61 \pm 0.05	F = 6.76; <i>p</i> = 0.000***	1.09
eCO ₂ +eT	0.68 \pm 0.03	F = 3.00; <i>p</i> = 0.08	0.48
Overall mean	0.71 \pm 0.02	(except eT)	

<i>F_{IS}</i>			
Factors	Mean \pm SE	Value F-ANOVA	% of variation
C	0.62 \pm 0.13	-	-
eCO ₂	0.54 \pm 0.16	F = 0.06; <i>p</i> = 0.80	0.01
eT	0.57 \pm 0.15	F = 0.00; <i>p</i> = 0.97	0.00
eCO ₂ +eT	0.58 \pm 0.11	F = 0.10; <i>p</i> = 0.74	0.02
Overall mean	0.57 \pm 0.02		

Table 3. Genetic divergence matrix. Analysis of F_{ST} statistics (Nei, 1973) between populations of *S. capitata* parents and offspring from different treatments (below diagonal). Caption: *** $p < 0.001$ after Fisher's Exact Test.

<i>Treatments</i>	F_{ST} (Parents)			F_{ST} (offspring)		
	C	eCO ₂	eT	C	eCO ₂	eT
C	-	-	-	-	-	-
eCO₂	0.164 <i>p</i> =0.95	-	-	0.045*** <i>p</i> <0.001	-	-
eT	0.293 <i>p</i> =0.25	0.280 <i>p</i> =0.07	-	0.106*** <i>p</i> <0.001	0.108*** <i>p</i> <0.001	-
eCO₂+eT	0.244 <i>p</i> =0.73	0.164 <i>p</i> =0.87	0.249 <i>p</i> =0.24	0.070*** <i>p</i> <0.001	0.053*** <i>p</i> <0.001	0.087*** <i>p</i> <0.001

Table 4. *S. capitata* crossing rates estimates, evaluated by replicates of each treatments. In parentheses numbers of standard deviation, obtained after 1000 bootstraps resamples. Mean values of each parameter are expressed followed by standard error.

Multi locus outcrossing rate: <i>tm</i>			
Factors	Mean \pm SE	Value F-ANOVA	% of variation
C	0.49 \pm 0.06	-	-
eCO ₂	0.54 \pm 0.04	F = 0.37; <i>p</i> = 0.55	2.55
eT	0.61 \pm 0.09	F = 0.12; <i>p</i> = 0.73	0.83
eCO ₂ +eT	0.47 \pm 0.06	F = 2.02; <i>p</i> = 0.18	13.95
Overall mean	0.53 \pm 0.03		

Single locus outcrossing rate: <i>ts</i>			
Factors	Mean \pm SE	Value F-ANOVA	% of variation
C	0.22 \pm 0.04	-	-
eCO ₂	0.25 \pm 0.02	F = 0.10; <i>p</i> = 0.76	0.69
eT	0.31 \pm 0.07	F = 0.88; <i>p</i> = 0.37	6.15
eCO ₂ +eT	0.24 \pm 0.02	F = 1.30; <i>p</i> = 0.27	9.14
Overall mean	0.26 \pm 0.02		

Mating among relatives: <i>tm-ts</i>			
Factors	Mean \pm SE	Value F-ANOVA	% of variation
C	0.27 \pm 0.07	-	-
eCO ₂	0.29 \pm 0.05	F = 0.24; <i>p</i> = 0.63	1.88
eT	0.30 \pm 0.03	F = 0.09; <i>p</i> = 0.77	0.69
eCO ₂ +eT	0.23 \pm 0.06	F = 0.69; <i>p</i> = 0.42	5.27
Overall mean	0.27 \pm 0.02		

Selfing rates among families: <i>rs</i>			
Factors	Mean \pm SE	Value F-ANOVA	% of variation
C	0.20 \pm 0.12	-	-
eCO ₂	0.43 \pm 0.15	F = 2.55; <i>p</i> = 0.13	15.76
eT	0.39 \pm 0.07	F = 1.61; <i>p</i> = 0.23	9.91
eCO ₂ +eT	0.55 \pm 0.13	F = 0.05; <i>p</i> = 0.82	0.32
Overall mean	0.39 \pm 0.07		

Artigo 3 (Em preparação): Elevated temperature and CO₂ increment on parental environment induced alterations on morphology and germination seeds from *Stylosanthes capitata* (Vogel)

Priscila Marllys Sá Rivas, Fernando Anacleto-Bonifácio, Ivan Schuster, Carlos Alberto Martinez y Huaman, Ana Lilia Alzate-Marin

Annals of Botany
Impact factor: 3.45

1 **Elevated temperature and CO₂ increment on parental**
2 **environment induced alterations on morphology and**
3 **germination seeds from *Stylosanthes capitata* (Vogel)**

4 **Annals of Botany (ISSN: 1095-8290, Impact-factor: 4.246)**

5
6 Priscila Marlys Sá Rivas^{1,2}, Fernando Anacleto-Bonifácio^{1,2}, Ivan Schuster³, Carlos Alberto
7 Martinez y Huaman⁴, Ana Lilia Alzate-Marin^{1,2*}

8
9 ¹Laboratory of Vegetal Genetics, Department of Genetics, School of Medicine of the University
10 of São Paulo (Ribeirão Preto Campus), Brazil;

11 ² Post-graduation program of genetics, School of Medicine of the University of São Paulo
12 (Ribeirão Preto Campus), Brazil;

13 ³Director of Molecular Breeding, Longping High-Tech, Brazil;

14 ⁴Laboratory of Vegetal Physiology, Faculty of Sciences and Letters of the University of São Paulo
15 (Ribeirão Preto Campus), Brazil.

16
17 *Corresponding author: Ana Lilia Alzate-Marin; ORCID: 0000-0003-3389-7048. Address:
18 Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética
19 - Bloco B, Laboratório de Genética Vegetal, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto,
20 SP, Brazil; Phone: +55 16 33153356; Fax: +55 16 33150222; e-mail: anaalzate@fmrp.usp.br

21
22 **Abstract**

23 Plants are vulnerable to environmental alterations through seed development that affects
24 seed germination and seedling establishment. However, information on the impact of
25 these changes on tropical plants is limited. Thus, we aimed to study the effects of
26 temperature and atmospheric CO₂ increase on parental plants of the tropical legume
27 *Stylosanthes capitata* Vogel about morphology and germination of their seeds. The plants
28 were grown and submitted to four treatments: control [C], warming +2°C [eT], an
29 increase of atmospheric CO₂ concentration by 600 ppm [eCO₂] and combination [eCO₂
30 + eT] in a field experiment in a Trop-T-FACE facility. After end lifecycle, we collect
31 seeds from 8 plants per treatment and evaluated the weight (mg) of 100 seeds, seeds coat
32 color, in vitro germinability (%) and the speed germination speed index (GSI).
33 Differences between the treatments were analyzed by ANOVA/Tukey (p<0.05). Seeds of
34 eT and eCO₂ + eT treatments produced a higher number of seeds by inflorescence (p<0,05).

35 Matrices from the eT treatment presented lower proportion of unviable seeds ($p < 0,05$).
36 Germinability and germination velocity were similar in all treatments ($p > 0,05$). Seedlings from
37 warming treatments also showed higher vigor and quality ($p < 0,05$). An increase in the
38 frequency of beige with dots coat-color-seeds was observed in warming treatments when
39 compared to the others ($p < 0,001$). This characteristic can be associated with greater
40 germinability. In conclusion, warming on *S. capitata* parental plants increased the
41 number of seeds produced, reduced seeds weight, and favored germination especially of
42 beige with coat-color-seeds. This research presents new results about maternal and
43 environmental features that can affect the survival strategies of *S. capitata* first-generation
44 offsprings to future climate changes.

45 **Keywords:** climate changes; *Stylosanthes*; germination.

46