

Aplicação de marcadores moleculares ISSRs em estudos de conservação e ecologia



<https://doi.org/10.56238/tecnolocienagrariabiosoci-047>

Beatriz Faustino Lima Mendonça

Mestranda em Genética Evolutiva e Biologia Molecular na Universidade Federal de São Carlos
E-mail: beatrizfaustinolima04@gmail.com

Alan Gomes Mendonça

Doutorando em Ciências Ambientais na Universidade Federal de São Carlos
E-mail: alanjipa@gmail.com

Rubiani de Cassia Pagotto

Doutora em Ciências Biológicas - Docente do Departamento Acadêmico de Biologia da Universidade Federal de Rondônia
E-mail: rubiani@unir.br

RESUMO

Dentre as ferramentas moleculares que utilizadas em estudos de composição gênica e estruturas de diversidade genética de populações, destaca-se o

marcador ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Esta técnica é baseada em reações de PCR (Polimerase Chain Reaction) de iniciador único que amplifica fragmentos localizados entre as repetições de sequência simples (SSR), sem o conhecimento prévio das sequências de DNA das espécies estudadas. Esta revisão teve como objetivo levantar informações bibliográficas da aplicação de marcadores ISSR em estudos de conservação e ecologia. Através das análises dos artigos encontrados, pôde-se observar a eficiência, baseado nas conclusões apresentadas pelos autores citados, destes marcadores para estabelecer relações ecológicas, desenvolver estratégias de proteção de espécies ameaçadas e compreender processos evolutivos e biogeográficos que atuam em de diferentes táxons como: plantas, fungos, vertebrados e invertebrados.

Palavras-chave: Diversidade, Fluxo gênico, Preservação, Polimorfismos genéticos, Relações ecológicas.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da composição gênica de uma espécie, ou população, é fundamental para ações de manejo e conservação, visto que fornece potencial adaptativo/evolutivo de uma espécie (GALETTI *et al.*, 2008). Deste modo, dados moleculares de variações genéticas apropriadas (neutra ou não) também podem ser informativos em áreas ecológicas, comportamentais e evolutivas (AVISE, 2010).

É fundamental avaliar se os padrões de estruturação da diversidade genética são resultantes de características naturais das espécies ou são consequência de barreiras físicas, muitas vezes produzidas por ações antrópicas (FAJARDO; ALMEIDA.; MOLINA. 2016) como a fragmentação dos ecossistemas, perda de habitat, superexploração, introdução de espécies exóticas, mudanças climáticas e poluição, tendo em vista que estas são as principais responsáveis pela perda de biodiversidade (MORRIS, 2010; MORA, 2013; BIRBEN, 2019). Neste contexto medidas eficazes de manejo em ecossistemas utilizando dados moleculares são necessárias, uma vez que, é importante preservar altos níveis de diversidade genética visando manter o potencial evolutivo de uma espécie ou população.



Estes dados podem ser gerados através de estudos de dinâmica populacional aplicando medidas de diversidade genética intra e interpopulacional que são estimadas a partir de dados de marcadores moleculares (COSTA, 2015; FAJARDO; ALMEIDA.; MOLINA. 2016, ROUNSEVELL *et al.*, 2018).

Os avanços da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiram o desenvolvimento de diversas classes de marcadores moleculares utilizados em casos de estudos genéticos, pois possibilitam analisar a variação genética em nível de DNA, esclarecendo eventos de diversidade genética, gargalos, fluxo gênico, endogamia, e deriva genética (SOUZA, 2008; SOUZA, 2015; FAJARDO; ALMEIDA; MOLINA. 2016). Dentre estes, destaca-se o *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), desenvolvido no início de 1990 e popularizado em 1998, a técnica é baseada em reações de PCR de iniciador único em que a sequência utilizada é derivada de repetições di- e trinucleotídicas, e a amplificação ocorre entre duas regiões de microssatélites (SSR) (WOLFE; XIANG; KEPHART, 1998; REDDY *et al.*, 2002; COSTA, 2015; NG & TAN, 2015).

Os microssatélites, conhecidos como SSR, são repetições de sequências simples em *tandem* de 2 a 5 nucleotídeos, frequentemente encontrados e dispostos ao acaso em todo o genoma eucarioto (SOUZA, 2015). Este marcador requer um conhecimento prévio da sequência de DNA que flanqueia o SSR para que os *primers* utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) sejam construídos (COSTA, 2015).

Devido a uma necessidade de explorar repetições de microssatélites sem o conhecimento prévio de DNA da espécie-alvo (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; NYBOM, 2004), foi desenvolvido o marcador *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), que se hibridiza diretamente com os SSRs (TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, 1996). Estes, segregam principalmente como dominantes após herança mendeliana, sendo interpretados semelhantes aos dados de RAPD. No entanto, em alguns casos, também foram demonstrados como co-dominantes, o que permite a distinção entre homozigotos e heterozigotos (TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, 1996; REDDY *et al.*, 2002).

As sequências – alvos dos ISSRs são abundantes ao longo do genoma de eucariotos e evoluem rapidamente (COSTA, 2015), sendo estes iniciadores popularmente conhecidos como microssatélites amplificados aleatórios (RAMs) (NG & TAN, 2015). Geralmente os *primers* possuem 16-25 pb de comprimento e produzem vários fragmentos de DNA (cada um dos quais é considerado um *loci*) de tamanhos diferentes (REDDY *et al.*, 2002; NG & TAN, 2015). Isso ocorre devido as regiões SSRs estarem espalhadas de maneira uniforme por todo o genoma, tornando alta as chances de amplificação entre as duas regiões adjacências dentro dos limites da *Taq DNA polimerase* para gerar muitas bandas polimórficas (WOLFE; XIANG; KEPHART, 1998). Estas características permitem uma maior superfície de ancoragem e maiores temperaturas de pareamento, tornando – os mais robustos quando comparados a outros marcadores dominantes como o RAPD (SOUZA,).



A interpretação das bandas é atribuída a *loci* genéticos com dois alelos, onde se utiliza 1 para presença e 0 para ausência (WOLFE, 2005). Os produtos amplificados pela técnica ISSR-PCR possuem o tamanho de 200 a 2000 pb de comprimento, e têm se destacado em estudos de variação/diversidade genética, filogenética e “impressão digital de DNA” (DNA *fingerprint*) (QIU *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2011; NG & TAN, 2015), o que possibilita a aplicação destes marcadores em estudos de conservação e ecologia.

Considerando que a técnica de ISSR tem sido amplamente utilizada por ser simples, rápida, eficiente, possuir alta reprodutibilidade e gerar altos índices de polimorfismo (REDDY *et al.*, 2002), este trabalho visa levantar informações do uso destes marcadores em estudos de conservação e ecologia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento bibliográfico foi realizado através do método de (BARDIN, 2016) onde é possível a formação de estruturas textuais por meio de análises documentais, tendo como objetivo a interpretação de informações de dados e a produção de uma análise específica sobre um determinado assunto. Esta revisão foi elaborada a partir de pesquisas de artigos teóricos e experimentais, livros, dissertações e teses, publicados entre janeiro de 1995 a maio de 2020, que utilizaram a técnica ISSR-PCR com ênfase em conservação e ecologia. Para isto, foram efetuadas buscas em português e inglês, empregando palavras chaves como “aplicação da técnica ISSR”, “estudos de conservação e ecologia”, “ISSR aplicado para estudos de diversidade”, “ISSR em ecologia” e “ISSR em estudos de conservação”.

A partir do resultado do levantamento realizado em bibliotecas eletrônicas como Scielo, Google Scholar e Periódicos CAPES, foi elaborado um banco de dados com 212 artigos relacionados com a aplicação dos marcadores ISSRs, dos quais 100 foram selecionados para discussão e a elaboração de gráficos. O critério para escolha dos artigos foi a análise documental que permitiu observar se os mesmos se enquadravam na aplicação da técnica para fins de conservação e ecologia das espécies, excluindo aqueles que não abordavam de maneira objetiva o tema em questão.

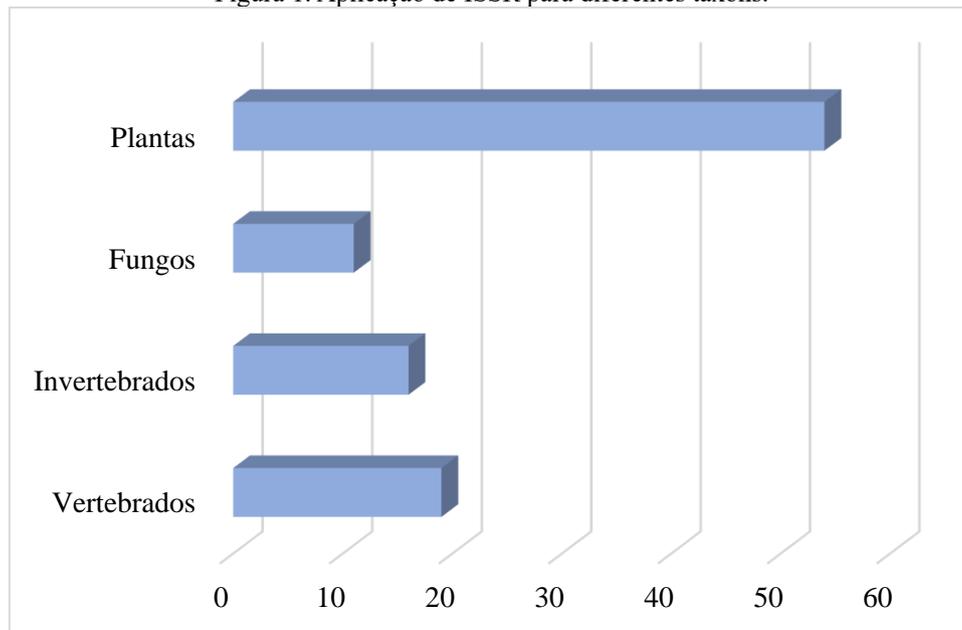
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 APLICAÇÃO EM CONSERVAÇÃO E ECOLOGIA

Por meio do levantamento bibliográfico realizado em plataformas científicas online, foi possível a elaboração de um gráfico que permite visualizar a aplicação dos marcadores ISSRs, com ênfase em ecologia e conservação (Figura 1), possibilitando identificar a distribuição dos artigos encontrados para os diferentes táxons.



Figura 1. Aplicação de ISSR para diferentes táxons.



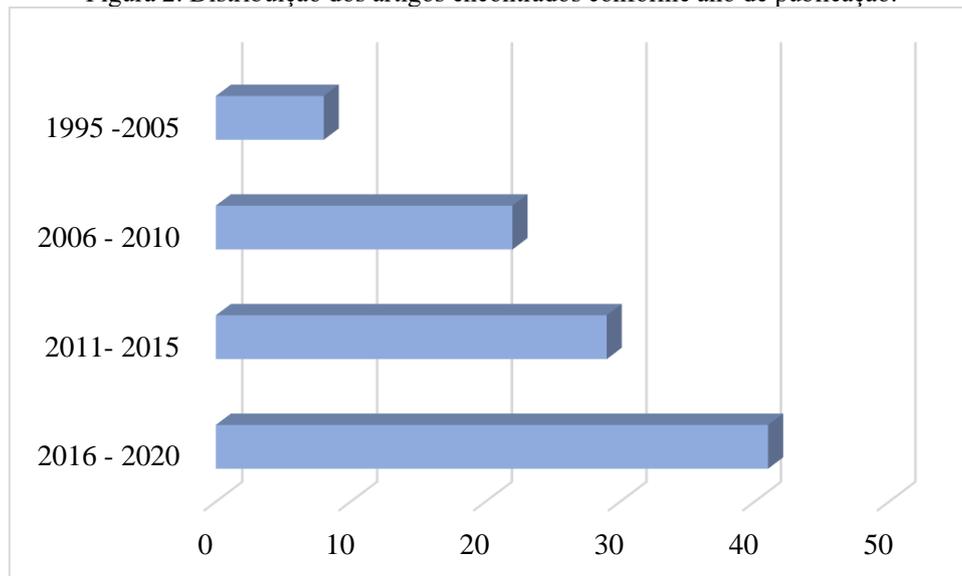
Dentre as pesquisas analisadas, encontrou-se um total de 54 artigos relacionando ecologia e conservação com a aplicação de ISSR em plantas, configurando o táxon com mais trabalhos. Estes valores podem estar relacionados com a origem deste marcador, uma vez que o mesmo foi desenvolvido para a aplicação em estudos de plantas cultivadas (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, 1996). Em seguida encontra-se o grupo dos vertebrados com 19 trabalhos, dos quais a maioria (12) se aplicam à ictiofauna (BI; YANG; GAO, 2011; YING; GAO; MIAO, 2011; KUMLA *et al.*, 2012; SAAD *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013; SAAD; ABUZINADAH; EL-DOMYATI, 2013; LABASTIDA *et al.*, 2015; VITORINO *et al.*, 2015; LI *et al.* 2016; FONSECA *et al.*, 2018; PAUL; MUKHOPADHYAY; BHATTACHARJEE, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Os artigos encontrados para a aplicação da técnica ISSR em invertebrados (09) teve por característica o conhecimento ecológico de espécies consideradas pragas (BORBA *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2020). Resultados semelhantes foram encontrados nas pesquisas que utilizaram este marcador no grupo de fungos (05), sendo grande parte dos trabalhos analisados objetivando compreender as relações ecológicas e evolutivas das espécies (DARIVA *et al.*, 2005; JING *et al.*, 2017; UMAÑA-CASTRO *et al.*, 2019; LONGYA; TALUMPHAI; JANTASURIYARAT, 2020).

Com o objetivo de observar a aplicação deste marcador ao longo do tempo, dos artigos analisados, 41% foram publicados nos últimos 5 anos (Figura 2). Este resultado indica que a aplicação da técnica ISSR para conservação e ecologia de diferentes táxons se tornou uma ferramenta útil para o desenvolvimento de pesquisas populacionais, que visam o conhecimento das relações ecológicas e o planejamento de atividades de proteção para espécies ameaçadas.

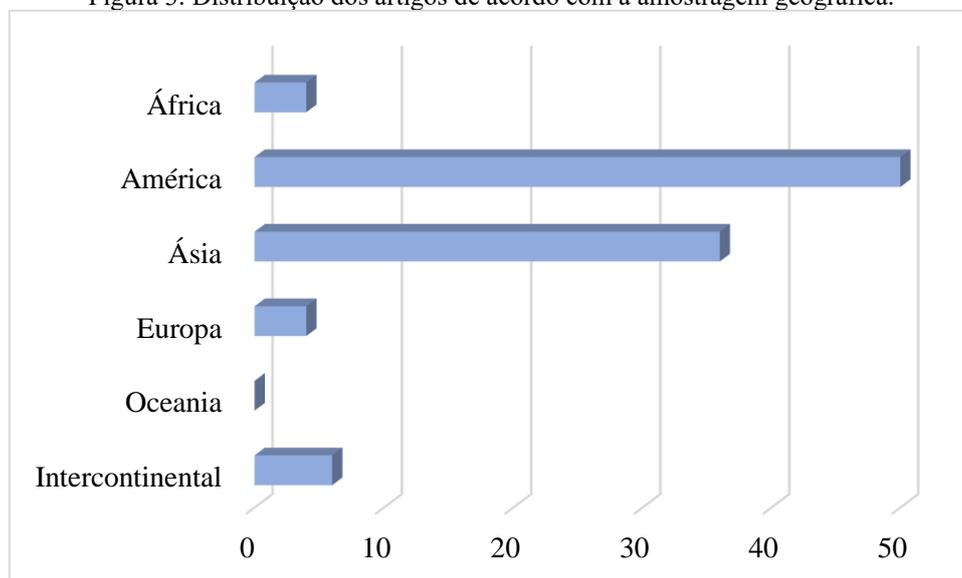


Figura 2. Distribuição dos artigos encontrados conforme ano de publicação.



Com relação à distribuição geográfica, já era esperado uma maior quantidade de artigos no continente Americano (Figura 3), visto que, as pesquisas bibliográficas foram realizadas buscando trabalhos publicados tanto na língua inglesa quanto na portuguesa. Porém, ao observarmos os outros continentes nota-se uma forte aplicação deste método no continente Asiático, onde publica-se vários artigos com esta abordagem temática em revistas de grande relevância científica.

Figura 3. Distribuição dos artigos de acordo com a amostragem geográfica.



Grande parte dos estudos, considerados como pertencentes à Ecologia Molecular, utiliza de polimorfismos genéticos em populações naturais como base para a compreensão de fenômenos evolutivos, demográficos ou ecológicos (MILLIGAN; LEEBENS-MACK; STRAND, 1994; FAJARDO; DE ALMEIDA; MOLINA, 2014). Os marcadores ISSRs foram desenvolvidos inicialmente para diferenciar espécies cultivadas (KANTETY *et al.*, 1995; TSUMURA, Y.; OHBA,



K.; STRAUSS, 1996), porém se tornaram de grande eficiência para uma faixa de aplicações de nível populacional e estudos interespecíficos de plantas, fungos, invertebrados e vertebrados (WOLFE; XIANG; KEPHART, 1998; WOLFE, 2005), incluindo estudos que visam investigar relações filogenéticas para compreender processos evolutivos e biogeográficos ou definir problemas de sistemática envolvendo espécies ameaçadas (MORITZ, 1995; FAJARDO; ALMEIDA.; MOLINA, 2016).

O uso desta técnica para estudos de espécies ameaçadas tem demonstrado eficiência para posterior planejamento de conservação, como demonstrado por Zhang; Chen; Li (1995) que ao aplicarem o ISSR para analisar a população de *Pinus squamata* (Pinales: Pinaceae), criticamente ameaçada de extinção, perceberam uma baixa variabilidade genética, sugerindo que processos evolutivos e ações antrópicas podem ter contribuído para a perda de diversidade genética. Resultados semelhantes foram obtidos em uma população de *Hesperozygis ringens* (Lamiales: Lamiaceae), que se encontra em processo de extinção, onde foi observada uma alta frequência de endogamia devido a baixos níveis de Heterozigosidade (FRACARO, 2006).

As correlações entre aplicações de marcadores ISSR e fatores ambientais foram estudadas em 17 populações de *Stipa tenacissima* (Poales: Poaceae), no qual os autores observaram uma baixa diversidade dentro das populações e uma alta diferenciação interpopulacional, sugerindo a necessidade da proteção de seus habitats críticos da fragmentação e degradação devido a homogeneidade intrapopulacional (BOUSSAID *et al.*, 2010). Um estudo semelhante foi desenvolvido por Górski (2015), onde observou que a transformação de ambientes florestais em áreas agrícolas desfavorece a espécie *Baccharis crispa* (Asterales: Asteraceae), popularmente conhecida como carqueja.

Em uma análise de 15 indivíduos de *Hancornia speciosa* (Gentianales: Apocynaceae) em uma população, foi observada uma baixa diversidade genética intrapopulacional utilizando os marcadores ISSR, o que possibilitou a criação de estratégias que visam a manutenção e conservação da espécie (COSTA *et al.*, 2015). Já a aplicação da técnica para 7 populações de *Melocanna bacifera* (Poales: Poaceae), uma espécie de bambu, permitiu a observação de uma alta diversidade em nível de espécie, porém uma baixa diferenciação entre as populações, indicando a necessidade de proteger as populações existentes na região do estudo (NILKANTA *et al.*, 2017).

O ISSR tem apresentado um papel importante em pesquisas que visam entender as relações ecológicas e evolutivas dos fungos. Resultados relevantes foram encontrados ao se analisar isolados de *Fasarium oxyporum* f. sp. *ciceris* (Hypocreales: Nectriaceae) provenientes de 13 diferentes províncias da Turquia, visto que, foi constatado que o alto fluxo gênico entre as populações tem um efeito significativo no desenvolvimento evolutivo da espécie (BAYRAKTAR; DOLAR; MADEN, 2008). A aplicação da técnica em *Corollospora marítima* (Microascales: Halosphaeriaceae), fungo



marinho cuja diversidade é ameaçada por atividades antrópicas em seus ecossistemas, permitiu a observação de altos níveis de variabilidade genética (VELEZ *et al.*, 2016).

Uma pesquisa desenvolvida em 4 populações de *Piptopurus betulinus* (Polyporales: Fomitopsidaceae), revelou descobertas que estabeleceram bases para o desenvolvimento de diversidade genética em *P. betulinus* de várias origens demográficas (JING *et al.*, 2017). A análise da diversidade de 8 populações de *Lepista nuda* (Agaricales: Tricholomataceae) permitiu, a partir da observação de um baixo grau de fluxo gênico interpopulacional, que fossem sugeridas estratégias de proteção para as populações (DU *et al.*, 2018).

Estudos aplicando marcadores ISSRs em grupos de invertebrados também têm mostrado bons resultados, como no trabalho onde a aplicação da técnica em 12 populações de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae), espécie não nativa do Brasil, revelou uma baixa variabilidade genética entre as populações que pode ser relacionada ao efeito fundador, sendo a variação interpopulacional menor do que a intrapopulacional. Além disso ao correlacionarem a distância genética com a distribuição geográfica atual da praga no Brasil sugeriram que as populações de *Z. subfasciatus* não se apresentam geograficamente estruturadas no país (SOUZA, 2018). Yang *et al.* (2018), observaram a influência da barreira geográfica natural na estrutura genética de 20 geopopulações de *Odontotermes formosanus* (Blattodea: Termitidae), espécie de cupim, e perceberam altos níveis de diferenciação genética entre as populações, revelando as possíveis vias de migração necessárias para o monitoramento da espécie.

A análise de populações de *Melipona mandacaia* (Hymenoptera: Apidae), abelhas sem ferrão, forneceu dados compatíveis com a interrupção do fluxo gênico por barreiras geográficas (NASCIMENTO *et al.*, 2010). O mesmo tema foi pesquisado por Miranda *et al.* (2012) na qual avaliaram a diversidade e estrutura genética de 104 colônias em 12 localidades da mesma espécie, e obtiveram baixos valores de heterozigosidade, além de observarem uma variação maior entre as localidades mais distantes, sugerindo um isolamento por distância.

A aplicação da técnica no grupo de vertebrados tem se destacado em pesquisas de diversidade entre populações. Em populações cultivadas e selvagens de *Trachidermus fasciatus* (Scorpaeniformes: Cottidae), uma espécie de peixe ameaçada de extinção, foi observada uma diversidade genética menor nas populações cativas, dados que fornecem informações importantes para preservação de espécies ameaçadas (BI; YANG; GAO, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por (OLIVEIRA *et al.*, 2019) ao estudarem populações cativas e selvagens de *Colossoma macropomum* (Characiformes: Characidae), no qual a população cultivada também apresentou menor diversidade. Vários trabalhos de genética populacional na ictiofauna apontam o marcador ISSR como eficiente para análises de variabilidade (NOVAIS, 2015; VITORINO *et al.*, 2015; LI *et al.* 2016; QUEIROZ *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2019).



Levando em consideração que os rios amazônicos funcionam como barreiras para a dispersão de aves amazônicas, Fernandes *et al.*, (2013) analisaram linhagens separadas por rios de *Glyphorynchus spirurus* (Passeriformes: Furnariidae). Para isto, utilizaram marcadores ISSRs em espécimes encontradas em áreas de endemismo do estado de Rondônia (Brasil) e do Inambari (Peru), onde observaram a existência de populações geneticamente diferenciadas em lados opostos do Rio Madeira. Estudos semelhantes foram realizados anteriormente (GONZALEZ & WINK, 2010), onde a técnica de ISSR foi utilizada para avaliação da filogeografia aviária. Os autores verificaram a variação genética e diferenciação populacional de 8 populações de *Aphrastura spinicauda* (Passeriformes: Furnariidae), e relataram baixos níveis de diferenciação entre as populações e alta variação intrapopulacional, sugerindo altos níveis de fluxo gênico entre elas, indicando uma colonização pós-glacial da espécie.

3.2 VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO ISSR

O método de ISSR tem se sido amplamente utilizado por ser uma técnica simples e rápida (REDDY *et al.*, 2002). Os marcadores são facilmente gerados com o mínimo de equipamentos e são variáveis, o que permite gerar uma grande quantidade de dados por um custo razoável para o pesquisador Wolfe, 2005. Além dessas características, os iniciadores utilizados são mais robustos, devido uma maior superfície de ancoragem, e possuem maiores temperaturas de pareamento, o que aumenta a reprodutibilidade dos produtos (TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, 1996; COSTA, 2015).

Pode-se destacar dentre as vantagens da técnica ISSR a realização de análises genéticas sem a construção de uma biblioteca genômica, ou seja, o conhecimento prévio da sequência genética da espécie a ser estudada não é necessário (LACERDA; ACEDO; LOVATO, 2002; RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK, 2004). Outro benefício encontrado é a possibilidade de estudar a abundância e distribuição de SSR no genoma (RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK, 2004).

Embora estes iniciadores tenham a vantagem de analisar múltiplos *loci* em uma única reação (COSTA, 2010), os ISSRs têm como principal limitação a classificação como marcadores dominantes (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; LIMA, 2008), o que não permite uma distinção clara entre homozigotos e heterozigotos (COSTA, 2015; NG & TAN, 2015; SOUZA, 2015). Além disso, é necessária uma otimização das reações iniciais e as estimativas de diversidade genética são baseadas em caracteres dialélicos (BAKKAPPA; SUBRAMANYA, 2011).

4 CONCLUSÃO

Apesar de, *a priori*, ser desenvolvida para análises de espécies de plantas cultivadas, a técnica ISSR tem ganhado espaço em estudos de diferentes táxons. O uso deste marcador em pesquisas de



conservação e ecologia é útil e tem sido amplamente utilizado, principalmente nos últimos 5 anos. Além disso, por não requerer o conhecimento prévio da sequência gênica do grupo em estudo e seu custo ser relativamente baixo, a técnica de ISSR destaca-se por ser uma ferramenta acessível, que permite gerar grandes números de dados importantes para o conhecimento ecológico das espécies, e planejamento de ações que visam a conservação.



REFERÊNCIAS

- Avise, J. C. Perspective: Conservation genetics enters the genomics era. *Conservation Genetics*, v. 11 n2, 665–669. 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-009-0006-y>
- Bakkappa, S.; Subramanya, G. Role of molecular markers (RAPD & ISSR) in silkworm. *International Journal of Advanced Biological Research*, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2011.
- Bardin, L. *Análise de Conteúdo*. Lisboa, Portugal; Edições 70, LDA, 2016.
- Bayraktar, H.; Dolar, F. S.; Maden, S. Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates on chickpea in Turkey. *Journal of Phytopathology*, v. 156 n3, 146–154. 2008. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01319.x>
- Bi, X.; Yang, Q.; Gao, T.; Li, C. The loss of genetic diversity during captive breeding of the endangered sculpin, *Trachidermus fasciatus*, based on ISSR markers: Implications for its conservation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, v. 29 n5, 958–966. 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s00343-011-0185-5>
- Birben, Ü. The effectiveness of protected areas in biodiversity conservation: the case of turkey. *Cerne*, v. 25 n4, 424–438. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/01047760201925042644>.
- Borba, R. S., Garcia, M. S., Kovalski, A., Oliveira, A. C., Zimmer, P. D., Castelo Branco, J.S. Malone, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotropical Entomology*, v. 34 n4, 565–569. 2005. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000400005>
- Boussaid, M.; Benito, C.; Harche, M. K.; Naranjo, T.; Zedek, M. Genetic variation in natural populations of *Stipa tenacissima* from algeria. *Biochemical Genetics*, v. 48 n10, 857–872. 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10528-010-9367-7>
- Costa, D. F. Vieira, F.A. Fajardo, C.V. Chagas, K.P.T. Diversidade genética e seleção de iniciadores issr em uma população natural de Mangaba (*Hancornia speciosa*) (APOCYNACEAE). *Rev. Bras. Frutic.*, v. 37 n4, 970–976. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-246/14>
- Costa, J. C. D. A. Utilização de Marcadores ISSR na Caracterização de Cultivares. p. 17. 2010. <http://lira.pro.br/wordpress/wp-content/uploads/downloads/2010/11/revisao-jose-carlos.pdf> Acesso em 02 de Set. de 2020.
- Costa, T. L. M. Diversidade genética em populações de *Myrsine umbellata* (PRIMULACEAE) em remanescentes da Floresta Atlântica. Dissertação de Mestrado - Curso de Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo. p 59. 2015. Disponível em: <http://repositorio.ufes.br/handle/10/5115>. Acesso em: 02 set. 2020.
- Dariva, J. M. Xavier, A. A. Costa, M. R. Ribeiro, R. C. F. Sousa, T. V. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* associados ao maracujazeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37 n2, 377–386. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-119/14>
- Dos Santos, L. F. Oliveira, E. J. Silva, A. S. Carvalho, F. M. Costa, J. L. Pádua, J. G. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. *Biochemical Genetics*, v. 49 n8, 540–554. 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s10528-011-9429-5>



Du J., Guo H-B., Li Q, Forsythe A., Chen X- H, Yu X-D. Genetic diversity of *Lepista nuda* (Agaricales, Basidiomycota) in Northeast China as indicated by SRAP and ISSR markers. PLoS ONE, v. 13 n8, 1–12. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202761>

Fajardo, C. G.; Almeida, V. F.; Molina, W. F. Conservação Genética de Populações Naturais: Uma Revisão para Orchidaceae. Biota Amazônia, v. 6 n3, 108–118. 2016. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n3p108-118>

Fajardo, C. G.; De Almeida, V. F.; Molina, W. F. Interspecific genetic analysis of orchids in Brazil using molecular markers. Plant Systematics and Evolution, v. 300 n8, 1825–1832. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-014-1009-9>

Fernandes, A. M. Gonzalez, J. Wink, M. Aleixo, A. Molecular Phylogenetics and Evolution Multilocus phylogeography of the Wedge-billed Woodcreeper *Glyphorynchus spirurus* (Aves, Furnariidae) in lowland Amazonia: Widespread cryptic diversity and parphyly reveal a complex diversification pattern. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 66 n1, 270–282. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.09.033>

Fonseca, V. L. Santos, J. S. Mascena, J. R. L. Rocha, N. N. C. Oliveira, C. S. T. Moreira, R. F. C. Análise da diversidade genética do robalo peva (*Centropomus parallelus*) na resex de Canavieiras, Bahia. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, v. 3 n3, 168–178. 2018. <https://doi.org/10.34188/bjaerv3n3-128>

Fracaro, F. Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo *in vitro* de *Hesperozygis ringens* BENTH. São Carlos. 104 f. Universidade Federal de São Carlos. 2006. <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/1542>

Galetti Junior P. M., Rodrigues F. P., Solé-Cava A. M., Miyaki C. Y., Carvalho D., Eizirik E., Veasey E. A., Santos F. R., Farias I. P., Vianna J. A., Oliveira L. R., Weber L. I., Almeida-Toledo L. F. de, Francisco M. R., Redondo R. A. F., Siciliano S., Del Lama S. N., Freitas T. R. O., Hrbek T., Molina W. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: Genética da conservação na biodiversidade brasileira. Ribeirão Preto: Editora SBG. 2008.

Gonzalez, J.; Wink, M. Genetic differentiation of the thorn-tailed Rayadito *Aphrastura spinicauda* (Furnariidae: Fasseriformes) revealed by ISSR profiles suggests multiple palaeoreugia and high recurrent gene flow. Ibis, v. 152 n4, 761–774. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2010.01060.x>
Górski, F. Seleção de primers ISSR e estrutura genética populacional de *Baccharis crispa* SPRENG. (ASTERACEAE) do sul do Brasil. Guarapuava. 59 f. Universidade Estadual do Centro-Oeste. 2015.

Jing, Y. Peng, M. Yang, L. Wang, Q. Evaluation of genetic diversity among *Piptoporus betulinus* as revealed by inter simple sequence repeat markers. Biotechnology and Biotechnological Equipment, v. 31 n2, 333–338. 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2016.1276413>

Kantety, R. V.; Zeng, X.; Bennetzen, J. L.; Zehr, B. E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding, v. 1 n4, 365–373. 1995. <https://doi.org/10.1007/BF01248414>

Kumla, S. Doolgindachbaporn, S. Sudmoon, R. Sattayasai, N. Genetic variation, population structure and identification of yellow catfish, *Myristus nemurus* (C&V) in Thailand using RAPD, ISSR and SCAR marker. Molecular Biology Reports, v. 39 n5, 5201–5210. 2012. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1317-x>



- Labastida, E. Cobián, D. Hénaut, Y. García-Rivas, M.C. Chevalier, P.P. Machkour-M'Rabet, S. Uso de marcadores ISSR para la determinación de especies y estudios genéticos del pez león, especie invasora en Guanahacabibes, Cuba. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 43 n5, 1011–1018. 2015. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-21>
- Lacerda, D. R.; Acedo, M. D. P.; Lovato, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 3 n2, 87–92. 2002. <https://www2.icb.ufmg.br/lundiana/Contents/CONTENTS322002.htm> Acesso em: 02 set. 2020.
- Li, W. Sun, WX. Fan, J. Zhang, C.C. Genetic diversity of wild and cultured swamp eel (*Monopterus albus*) populations from central China revealed by ISSR markers. *Biologia (Poland)*, v. 68 n4, 727–732. 2013. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0203-5>
- Li, Y-L.; Xue, D-X.; Gao, T-X.; Liu, J-X. Genetic diversity and population structure of the roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus* Heckel) inferred from microsatellite analyses: implications for its conservation and management. *Conservation Genetics*, v. 17 n4, 921–930. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10592-016-0832-7>
- Lima, L. M. D. E. Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular. Embrapa, p. 1–28. 2008. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA-2009-09/22214/1/DOC191.pdf> Acesso em 02 de Set. de 2020.
- Longya, A.; Talumphai, S.; Jantasuriyarat, C. Morphological characterization and genetic diversity of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, from thailand using ISSR and SRAP markers. *Journal of Fungi*, v. 6 n1, 38-51. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6010038>
- Melo, A. S.; Cruz, G. A. S.; Félix, A. P.; Rocha, M.F.; Loreto, V.; Moura, R.C. Wide dispersion of B chromosomes in *Rhammatocerus brasiliensis* (Orthoptera, acrididae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 43 n3, 1–13. 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0077>
- Milligan, B. G.; Leebens-Mack, J.; Strand, A. E. Conservation genetics: Beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*, v. 3 n4, 423–435. 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1994.tb00082.x>
- Miranda, E. A.; Batalha-Filho, H.; Oliveira, P. S.; Alves, R. M. O.; Campos, L. A. O.; Waldschmidt, A. M. Genetic diversity of *Melipona mandacaia* SMITH 1863 (Hymenoptera, Apidae), an endemic bee species from Brazilian Caatinga, using ISSR. *Psyche (London)*, v. 12 n1, 1-6. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/372138>
- Mora, C.; Zapata, F. A. Anthropogenic footprints on biodiversity. *The Balance Of Nature And Human Impact*, 239-258. 2013. <http://dx.doi.org/10.1017/cbo9781139095075.024>.
- Moritz, C. Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, v. 349 n1, 113–118. 1995. <https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0097>
- Morris, R. J. Anthropogenic impacts on tropical forest biodiversity: a network structure and ecosystem functioning perspective. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, v. 365 n1558, 3709-3718. 2010. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2010.0273>.
- Nascimento, M. A., Batalha-Filho, H. Waldschmidt, A. M., Tavares, M. G., Campos, L. A. O., Salomão, T. M. F. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier



(Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology*, v. 33 n2, 394–397. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572010005000052>

Ng, W. L.; Tan, S. G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Are we doing it right? *ASM Science Journal*, v. 9 n1, 30–39. 2015.

Nilkanta, H.; Amom, T.; Tikendra, L.; Rahaman, H.; Nongdam, P. ISSR Marker Based Population Genetic Study of *Melocanna baccifera* (Roxb.) Kurz: A Commercially Important Bamboo of Manipur, North-East India. *Scientifica*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3757238>

Novais, L. F. Estrutura genética de populações da espécie *Rachycentron canadum*, por meio de marcadores ISSR. Cruz das Almas, BA. 69f.; il. 2015.

Nybom, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, v. 13 n5, 1143–1155. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x>

Oliveira, C. D. E. S. T. Moreira, R. F. C. Soares Filho, A. A. Fonteles, S. B. A. Evangelista-Barreto, N. S. Genetic diversity in natural populations of *Colossoma macropomum* in the Brazilian Amazon region and in populations farmed in Northeast Brazil based on ISSR markers. *Aquaculture International*, v. 27 n5 1423–1434. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00395-1>

Paul, A.; Mukhopadhyay, T.; Bhattacharjee, S. Genetic Characterization of *Barilius barna* (Hamilton, 1822) in the Teesta River of Sub-Himalayan West Bengal, India, Through RAPD and ISSR Fingerprinting. *Proceedings of the Zoological Society*, v. 71 n3, 203–212. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12595-016-0191-x>

Qiu, Y. X. Sun, Y. Zhang, X.P. Lee, J. Fu, C.X. Comes, H.P. Molecular phylogeography of East Asian *Kirengeshoma* (Hydrangeaceae) in relation to Quaternary climate change and landbridge configurations. *New Phytologist*, v. 183 n2, 480–495. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02876.x>

Queiroz, C. A.; De. Sousa, N. R.; Silva, G. F.; Inoue, L. A. K. A. Impacts of stocking on the genetic diversity of *Colossoma macropomum* in central Amazon, Brazil. *Genetics and Molecular Research*. V. 15 n1, 1–9. 2016. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027700>

Rakoczy-Trojanowska, M.; Bolibok, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular and Molecular Biology Letters*, v. 9 n2, 221–238. 2004.

Reddy, M. P.; Sarla, N.; Siddiq, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, v. 128 n1. 9–17. 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>

Rounsevell, M., Fischer, M., Torre-Marín R. A., Mader, A (eds.). The IPBES regional assessment report on biodiversity and ecosystem services for Europe and Central Asia. Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 892 pages. 2018.

Saad, Y. M. Rashed, M. A. Atta, A. H. Ahmed, N. E. Genetic diversity among some tilapia species based on ISSR markers. *Life Science Journal*, v. 9 n4, 4841–4846. 2012.



Saad, Y. M.; Abuzinadah, O. A. H.; El-Domyati, M. F. Monitoring of genetic diversity in some parrotfish species based on inter simple sequence repeats polymorphism. *Life Science Journal*, v. 10 n4, 1841–1846. 2013.

Souza, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: Uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17 n3, 495–503. 2015. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_071

Souza, G. A.; Carvalho, M. R. O.; Martins, E. R.; Guedes, R. N. C.; Oliveira, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43 n7, 843–849. 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2008000700008>

Tsumura, Y.; Ohba, K.; Strauss, S. H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menzies*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoret. Appl. Genetics*, v. 92 n1, 40–45. 1996. <https://doi.org/10.1007/BF00222949>

Umaña-Castro, J. Orozco-Cayasso, S. Umaña-Castro, R. Molina-Bravo, R. Identificación molecular y características fisiológicas de aislamientos de *Trichoderma* para el biocontrol de dos patógenos en la piña Molecular Identification and Physiological Characteristics of *Trichoderma* Isolates for the Biocontrol of Two Pathogens in. *Trop J Environ Sci*, v. 53 n1, 125–142. 2019. <http://dx.doi.org/10.15359/rca.53-1.7>

Velez, P. Quintero, C. A. Merino, G. Gasca-Pineda, J. González, M. C. An ISSR-based approach to assess genetic diversity in the marine arenicolous fungus *Corollospora maritima* sensu lato. *Mycoscience*, v. 57 n3, 187–195. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2016.01.002>

Vitorino, C. A.; Oliveira, R. C. C.; Margarido, V. P.; Venere, P. C. Genetic diversity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the araguaia-tocantins basin estimated by ISSR marker. *Neotropical Ichthyology*, v. 13 n3, 557–568. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20150037>

Wolfe, A. D.; Xiang, Q.Y.; Kephart, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Science*, v. 7 n9, 1107–1125. 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00425.x>

Wolfe, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods in Enzymology*, v. 395 n1, 134–144. 2005. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(05\)95009-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(05)95009-x)

Yang, Y. Q.; Wang, Q.; Wang, Z.; Pang, Z. P.; Long, Y.H. Population diversity of *Odontotermes formosanus* (Shiraki) (Termitidae, Macrotermitinae) from different geographic locations in Anhui Province, China. *Sociobiology*, v. 65 n3, 497–505. 2018. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i3.1146>

Ying, Y.; Gao, T.; Miao, Z. Genetic differentiation of Japanese sardinella (*Sardinella zunasi*) populations in the Northwest Pacific revealed by ISSR analysis. *Journal of Ocean University of China*, v. 10 n4, 417–424. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11802-011-1830-5>

Zhang, Z. Y.; Chen, Y. Y.; Li, D. Z. Detection of low genetic variation in a critically endangered Chinese pine, *Pinus squamata*, using RAPD and ISSR markers. *Biochemical Genetics*, v, 43 n6, 239–249. 2005. <https://doi.org/10.1007/s10528-005-5215-6>



Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v. 20 n2, 176–183. 1994. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>