

# ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE RESISTÊNCIA A NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS EM OVINOS DA RAÇA CORRIEDALE COM MARCADORES RAPD

## RAPD MARKERS TO STUDY GENETIC VARIABILITY TO GASTROINTESTINAL NEMATODES IN CORRIEDALE BREED SHEEP

Ana Paula Nunes<sup>1</sup>; Antonio Costa de Oliveira<sup>2</sup>; Maria Elisabeth Aires Berne<sup>3</sup>; Marcos Flávio Silva Borba<sup>4</sup>; Flávio Echevarria<sup>4</sup>; Clara Maria Vaz<sup>5</sup>; Fernando Irajá Felix Carvalho<sup>2</sup>

### RESUMO

Para a seleção inicial de reprodutores, a variabilidade genética da resistência a nematódeos gastrintestinais de 117 cordeiros Corriedale, naturalmente infectados, foi analisada por agrupamento pelos métodos de Ligação Média e Componente Principais, usando dados de 68, 135, 211 e 264 marcadores de RAPD; e análise de variância e correlações. Os animais encontram-se em distribuição normal dentro de três categorias fenotípicas de OPG, onde o valor do LogOPG dos maiores foi 100 vezes superior ao dos menores. Verificou-se efeito de sexo, pai e desafio sobre o LogOPG dos cordeiros. A partir do maior número de marcadores é possível identificar até cinco grupos genéticos, onde a maioria dos cordeiros apresenta igual resposta aos endoparasitos. Os resultados permitiram concluir que há variabilidade genética da resistência a parasitos nematódeos gastrintestinais em cordeiros Corriedale e que a técnica de RAPD permite discriminar indivíduos com respostas distintas quando avaliados com mais de 250 marcadores.

Palavras-chave: cordeiros, RAP, endoparasitos.

### ABSTRACT

The genetic variability for resistance of 117 Corriedale lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes, as a starting point for the selection of breeds, was analysed by clustering procedures through Average Linkage and Principal Component analyses, using data from 68, 135, 211 and 264 RAPD markers. Analyses of Variance and Correlations were also performed. The animals were spread into a normal distribution within three phenotypic classes of LogEPG, where the LogEPG highest values were 100-fold superior to the lower values. There are sex, parent and challenge effects on the lamb LogEPGs. From the higher number of markers it is possible to identify up to five genetic groups where the majority of lambs present equal response to the endoparasites. The results allowed to conclude that there is genetic variability for resistance to gastrointestinal nematode parasites in Corriedale lambs, as detected by the RAPD technique, discriminating individuals with distinct responses when more than 250 markers were applied.

Key words: lambs, RAPD, endoparasites.

### INTRODUÇÃO

A infecção parasitária dos ovinos tem sido uma das principais causas da baixa produtividade desta espécie animal, com a redução na produção de lã e eficiência reprodutiva, da diminuição qualitativa e quantitativa do ganho de peso e componentes da carcaça, mortalidade de animais, levando a

uma menor pressão de seleção, somada ao custo de reposição dos animais e despesas com anti-helmíntico e mão-de-obra. O controle realizado basicamente através de tratamentos com vermífugos tem demonstrado uma perda de eficiência devido à crescente resistência dos parasitos a estes. No caso dos ovinos, o *H. contortus* é a espécie mais importante, visto sua patogenicidade e distribuição geográfica. A grave situação da resistência química no Rio Grande do Sul, sul do Brasil é relatada por ECHEVARRIA et al. (1996), onde aproximadamente 90% dos rebanhos testados apresentam nematódeos gastrintestinais resistentes ao grupo químico dos benzimidazóis, 84% aos levamisoles, 20% ao closantel e 13% de resistência à ivermectina, além de 73% de resistência múltipla. Situações semelhantes ocorrem no Uruguai (BONINO, 2003; CASTELLS et al., 2003) e na Argentina (ROMERO, 2003).

Considera-se que apenas o uso de controle químico não seja capaz de controlar as parasitoses gastrintestinais dos ovinos, o que aponta para o controle integrado com medidas não-químicas, como o desenvolvimento de vacinas, controle biológico, manejo nutricional estratégico e melhoramento animal para resistência a endoparasitos; todas enfatizando a sustentabilidade ambiental e econômica da produção. Dentre estas alternativas, a redução na frequência de tratamentos anti-helmínticos sem perda da produtividade e com benefícios epidemiológicos, pode ser alcançada pela seleção genética de animais naturalmente resistentes a parasitos internos. Esta linha de pesquisa vem sendo estudada com bastante ênfase em países como Austrália e Nova Zelândia, assim como nos da América do Sul (CASTELLS et al., 2003), visto ser um método efetivo e permanente (CARDELLINO & ROVIRA, 1987).

A resistência natural dos animais a helmintos é definida como a habilidade do hospedeiro de suprimir o estabelecimento e o subsequente desenvolvimento de infecções parasitárias (KASSAI & SRÉTER, 1992). Deste modo, os ovinos considerados naturalmente resistentes ao *H. contortus*, possuem parasitos menores, com menor oviposição, sendo os ovos eliminados mais cedo e de forma mais eficiente. Segundo STEAR & WAKELIN (1998), os mecanismos biológicos envolvidos na resistência natural a parasitos são regulados por genes de ação seqüencial; o que torna a resistência determinada geneticamente. Como na maioria das características de importância econômica, vários genes podem estar envolvidos no controle da resistência, dito

<sup>1</sup> Dra. Médica Veterinária, Depto. Morfologia, Instituto de Biologia, UFPEL. Autor para correspondência: apndzoot@yahoo.com.br

<sup>2</sup> PhD. Eng. Agrônomo, professor do Depto. Fitotecnia, FAEM, UFPEL.

<sup>3</sup> PhD Méd.Vet. Professora do Depto. Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPEL.

<sup>4</sup> PhD Méd.Vet. Pesquisador do CPPSUL, EMBRAPA-BAGÉ-RS

<sup>5</sup> MsC. Méd.Vet. Pesquisadora do CPPSUL, EMBRAPA-BAGÉ-RS

controle poligênico, e a variação entre indivíduos seria então de natureza quantitativa, seguindo uma distribuição normal.

Para analisar a variabilidade e a diversidade genética em espécies animais têm sido aplicados marcadores moleculares; dentre eles os mais utilizados são do tipo RAPD-Random Amplified Polymorphic DNA; Microssatélites; ISSR-Inter Microssatélites; e RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism (CUSHWA & MEDRANO, 1994; ZIETKIEWICZ et al., 1994; KANTANEN et al., 1995; CUSHWA et al., 1996; RAO et al., 1996; GORTARI et al., 1997; HORNG & HUANG, 2000; SHARMA et al., 2000). Na sua maioria, os trabalhos utilizaram os marcadores para a diferenciação intraespécies, interlinhagens, intersexos e interespecies, os quais permitiram sua diferenciação. No caso de ovinos, os marcadores moleculares permitiriam a identificação de animais resistentes aos endoparasitos, sem a necessidade de expressar os genes de resistência no indivíduo em estudo ou em seus descendentes; sendo útil na seleção precoce desses animais. A curto prazo, uma vez identificados geneticamente, através de Seleção Assistida por Marcadores (SAM), estes ovinos poderão ser usados como reprodutores em rebanhos comerciais, visando introduzir a característica e aumentar o desempenho de sua prole, frente ao desafio natural de parasitos (WAKELIN, 1984). Já BEH & MADDOX (1996), bem como CARDELLINO (2003), defendem que primeiramente sejam as cabanhas a incluírem a resistência aos parasitos gastrintestinais nos seus programas de melhoramento genético, visando o uso dos reprodutores para aumentar o ganho genético da característica.

Estima-se que o genoma ovino tenha aproximadamente 3000 cM, o que segundo LESSA et al. (2003), implica no uso mínimo de 100 a 150 marcadores polimórficos distribuídos no genoma para assegurar que ao menos um destes encontre-se a uma distância genética detectável do gene de interesse. Entretanto, BEATTIE (1994) comenta que a eficiência da seleção assistida por marcadores seria máxima quando mais de 500 marcadores polimórficos em cada pai forem produzidos, sendo que abaixo deste número a referida eficiência permaneceria quase constante.

A técnica de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) permite fazer uma varredura ao longo de todo o genoma, inclusive em regiões de DNA repetitivo. CUSHWA & MEDRANO (1994) apontam também como vantagem desta técnica a possibilidade de cada *primer* avaliar entre 5 e 15 locos durante uma mesma PCR, além de gerar um grande número de marcadores facilmente detectáveis em um período de tempo relativamente pequeno. No caso de ovinos com distintas respostas frente aos endoparasitos, poderia-se estabelecer diferenças entre os grupos que permitiriam identificar cada um destes para análise do polimorfismo dos marcadores gerados no RAPD.

Não há um consenso na quantidade de marcadores moleculares a serem usados nos estudos de variabilidade genética entre indivíduos, porém sabe-se que quantidades maiores de marcadores, teoricamente gerariam maior informação a respeito da variabilidade avaliada. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo estudar a variabilidade genética em ovinos Corriedale frente a parasitos nematódeos gastrintestinais, utilizando a técnica de RAPD com um número crescente de marcadores moleculares, como fator de maior eficiência e indicação de uso para a identificação de ovinos resistentes e suscetíveis a endoparasitos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Um total de 106 ovelhas Corriedale foram acasaladas com 4 carneiros da mesma raça, produzindo 117 cordeiros na primavera de 1996 na cabanha Paraíso, na cidade de Herval, Rio Grande do Sul, Brasil. Todos os cordeiros foram criados nas mesmas condições de manejo, tal como: na ocasião do desmame (5 meses), foram dosificados com anti-helmíntico, para eliminar possíveis parasitos, e pesados. Depois destes procedimentos foram, por duas vezes consecutivas, desafiados naturalmente sob pastoreio em campos com nematódeos gastrintestinais, utilizando o protocolo descrito por McEWAN (1994). O monitoramento da infecção foi realizado a cada 20 dias através da análise de fezes para contagem de ovos por grama de fezes (OPG), pela técnica modificada de GORDON & WHITLOCK (1939), e cultura de larvas pela técnica de ROBERTS & O'SULLIVAN (1950), sendo que na última coleta procedeu-se nova pesagem dos cordeiros. Ao final de ambos desafios, os animais que apresentaram OPGs (OPG1 – primeiro desafio e OPG2 – segundo desafio) menores que um desvio padrão da média do grupo contemporâneo foram classificados como "Resistentes" (R) e os que tiveram valores maiores que um desvio padrão como "Suscetíveis" (S). Todos os demais casos foram incluídos no grupo de animais "Normais"(N).

### Extração de DNA

Foram colhidas amostras de 10 ml de sangue da jugular dos cordeiros R e S, e armazenadas a 4°C até sua utilização. Todos os processos laboratoriais foram realizados no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas-RS, Brasil.

De cada indivíduo, duas extrações independentes de DNA foram processadas através do seguinte protocolo: obtenção de leucócitos através da lise de 5 ml de sangue total com 5 ml de solução hemolítica (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM NaCl) durante 5 seqüências de centrifugação por 10 min a 2000 rpm a 4°C seguida da ressuspensão de *pellet* em novos 5 ml desta solução; lise dos leucócitos com Proteinase K (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8,8; 0,5% SDS a 0,5%, 20 mg mL<sup>-1</sup> Proteinase K); seguida pela adição de NaCl 5M e centrifugação por 20 min a 14000 rpm; adição ao sobrenadante de 2 volumes de Etanol absoluto; centrifugação por 5 min a 14000 rpm e nova lavagem com Etanol 70%; uma última centrifugação por 5 min a 14000 rpm e eliminação do sobrenadante. Por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em 500 µL de TE pH 8,0 e estocado a 4°C por 16 horas; quando foram quantificadas por comparação visual com o marcador fago  $\lambda$ /HindIII (GIBCO), e diluídas para 10 ng µL<sup>-1</sup>.

### Seleção de *Primers* e Reações de RAPD

Foram realizadas reações de RAPD utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) produzidos pela University of British Columbia - UBC, para selecionar dentre uma centena (UBC1 ao UBC100, 69% G+C) os que produziram ampliações consistentes. Trinta e nove *primers* foram selecionados (UBC 1, 2, 3, 5, 6, 12, 13, 16, 17, 18, 23, 28, 29, 32, 33, 43, 44, 47, 49, 50, 51, 55, 56, 57, 61, 70, 71, 72, 73, 75, 79, 81, 84, 85, 90, 92, 97, 98, 100); os quais foram agrupados por sorteio em 4 conjuntos contendo 9, 19, 30 e 39 *primers*, sendo analisados de forma acumulativa, em grupos com um número crescente de marcadores RAPD.

Procedeu-se as reações nas seguintes condições: 2,5 µL de Tampão de Reação 10X; 200 µM de cada dNTP; 10 pmol de *primer* 20 ng de DNA genômico, 1,0 unidade de Taq DNA polymerase (Pharmacia Biotech); totalizando um volume final de 25 µL de reação. Tais reações foram realizadas em termociclador PTC -100 (MJ Research, Inc.), com capacidade para 96 amostras. O programa incluiu uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min, seguida de 45 ciclos compostos de 94°C por 1 min para desnaturação, 38°C por 1 min para o anelamento dos *primers*, e 72°C por 1,5 min para a extensão. Uma extensão final de 72°C por 5 minutos foi adicionada.

#### Análise das reações

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados porque eletroforese em gel de agarose a 1,2% e corados com brometo de etídio. O perfil dos amplificados foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado para leitura, onde apenas bandas presentes nas duas reações do mesmo indivíduo foram consideradas. A determinação dos pesos moleculares das amplificações foi feita por comparação com marcador fago  $\lambda$ /*HindIII* (GIBCO) que foi incluído em cada gel.

#### Análise estatística

Para análise dos dados de OPG, primeiramente foi realizada a transformação em  $\text{Log}_{10}(\text{OPG}+25)$  para normalizá-los. Na análise de variância dos valores de OPGs, pesos e ganho de peso, foram incluídos no modelo os efeitos fixos de pai, sexo e classe fenotípica (R, S, N) dos cordeiros. Comparações da média dos dois primeiros efeitos, pelo Teste de Tukey, foram realizadas com o auxílio do programa SAS (SAS, 1996). Também foram calculadas correlações de Pearson entre os dados de OPG e de peso dos animais.

Com base nos marcadores moleculares produzidos, todos os dados gerados foram analisados por agrupamento pelo Método de Ligação Média e de Componentes Principais, também através do programa SAS (1996).

## RESULTADOS

Os valores descritivos de OPGs dos três grupos fenotípicos são apresentados na Tabela 1. Pela análise das larvas obtidas nas culturas de fezes verificou-se uma prevalência de 99,99% de *H. contortus*.

Na seleção fenotípica, 5% dos cordeiros foram classificados como Resistentes (R), 6,3% como Suscetíveis (S) e os demais 88,7% como Normais (N). Pela análise de variância, o sexo do cordeiro apenas influenciou o OPG1, maior nos machos ( $P<0.05$ ). Tanto o valor do OPG1, quanto do OPG2 dos cordeiros foram influenciados pela classe fenotípica ( $P<0.05$ ). No contraste de médias, além de ambos OPGs diferirem entre as classes fenotípicas, verificou-se distintos valores destes nas comparações entre sexos e entre pais ( $P<0.05$ ).

Observou-se correlações fenotípicas de média a baixa magnitude entre OPGs, pesos e ganhos de pesos (Tabela 2). O OPG1 foi responsável por uma variação de 10% no OPG2, e de apenas 3% sobre a variação sofrida por ambos pesos analisados.

Na seleção de *primers* do conjunto total, 56% (56/100) apresentaram pelo menos uma amplificação, onde 21% (12/56) amplificaram apenas um fragmento e 27% (15/56) não apresentam polimorfismo nos produtos. Sessenta e nove por cento dos *primers* (39/56) geraram produtos com alta resolução e polimórficos, os quais foram então utilizados neste estudo. Ao todo foram gerados 291 fragmentos, sendo que 90% (264/291) eram polimórficos entre os cordeiros avaliados (entre 3 a 16 fragmentos). Cinquenta e sete por cento dos *primers* produziram mais de cinco fragmentos polimórficos. Analisaram-se os 264 marcadores polimórficos conforme foram sendo realizadas as reações nos 4 grupos de *primers*, compostos respectivamente por 68 marcadores (9 *primers*), 135 marcadores (19 *primers*), 211 marcadores moleculares (30 *primers*), e 264 marcadores (39 *primers*).

Tabela 1 - Valores médios, mínimos e máximos de ovos por grama de fezes (OPG<sub>1</sub> – primeiro desafio e OPG<sub>2</sub> - segundo desafio) de cordeiros Corriedale naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais.

Fenótipo	Número de cordeiros	OPG					
		OPG <sub>1</sub>			OPG <sub>2</sub>		
		média	mínimo	máximo	média	mínimo	máximo
Resistente	6	0	0	0	0	0	0
Normal	103	700	0	4200	400	0	1200
Suscetível	8	2300	1400	4000	1200	800	2400

Tabela 2 - Coeficiente de correlação fenotípica ( $P<F$ ) entre peso ao desmame (PD), peso final (PF), ganho de peso (GP), primeiro desafio (ovos por grama de fezes - OPG<sub>1</sub>) e segundo desafio (ovos por grama de fezes - OPG<sub>2</sub>), de cordeiros Corriedale naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais.

	OPG <sub>2</sub>	PD	PF	GP
OPG <sub>1</sub>	0,32 (0,63)	0,16 (0,39)	0,18 (0,08)	0,04 (0,09)
OPG <sub>2</sub>		-0,09 (0,80)	-0,17 (0,28)	-0,14 (0,29)
PD			0,85 (0,99)	(-0,23)
PF				0,31 (0,0001)

Com os 68 marcadores iniciais, a média de polimorfismo foi de 7,5 bandas/*primer*, com 135 marcadores foi de 7,1; com 211 marcadores foi de 7,0 e com os 264 marcadores totais foi de 6,8. O conjunto dos 9 *primers* inicialmente avaliados permitiu verificar que o primeiro componente principal foi

responsável por 19,8% da variação e o segundo componente principal por 13,7% desta (Figura 1). Na segunda análise, com 135 marcadores, estes componentes foram responsáveis por 17,9% e 12,0%, respectivamente (Figura 2). Nos resultados com 211 marcadores o primeiro componente principal explicou

16,9% da variação e o segundo, 12,4% desta (Figura 3); enquanto na análise final, com os dados gerados pelos 39 *primers* (264 marcadores) os dois primeiros componentes principais explicam respectivamente 14% e 12% da variação (Figura 4).

Utilizando os mesmos quatro conjuntos de marcadores moleculares acima descritos, foram calculadas as distâncias médias entre os indivíduos R e S. Estas análises de agrupamento formaram conjuntos com seis, cinco, cinco e cinco grupos, os quais podem ser observados nas Figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

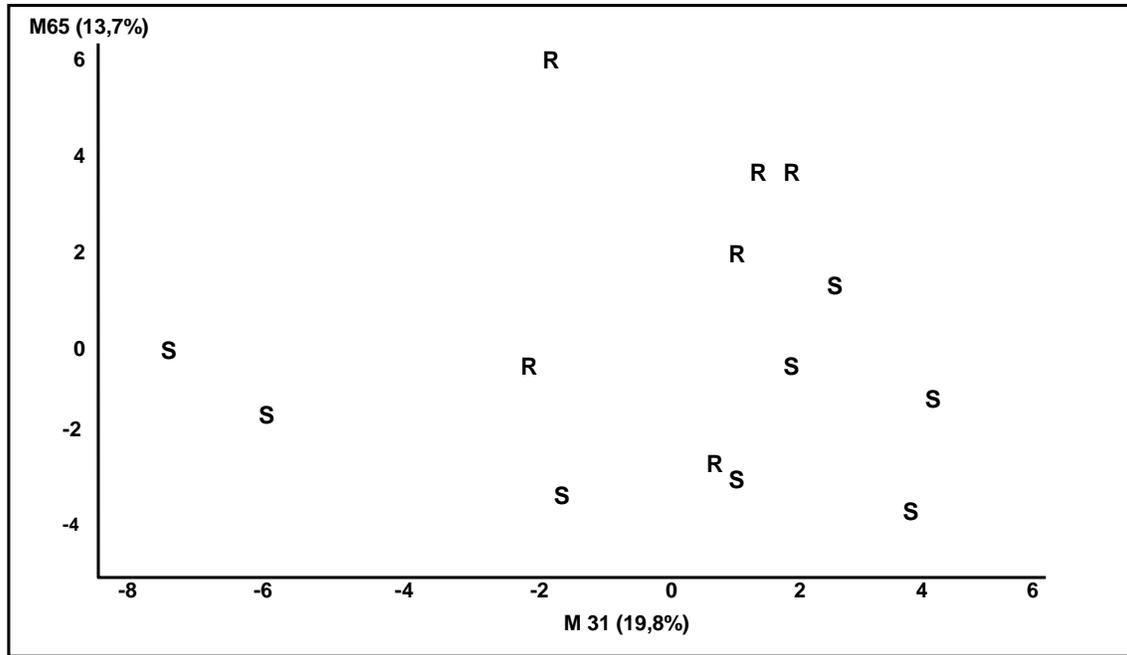


Figura 1 - Análise de componentes principais com 68 marcadores entre cordeiros Corriedale resistentes (R) e suscetíveis (S) naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais.

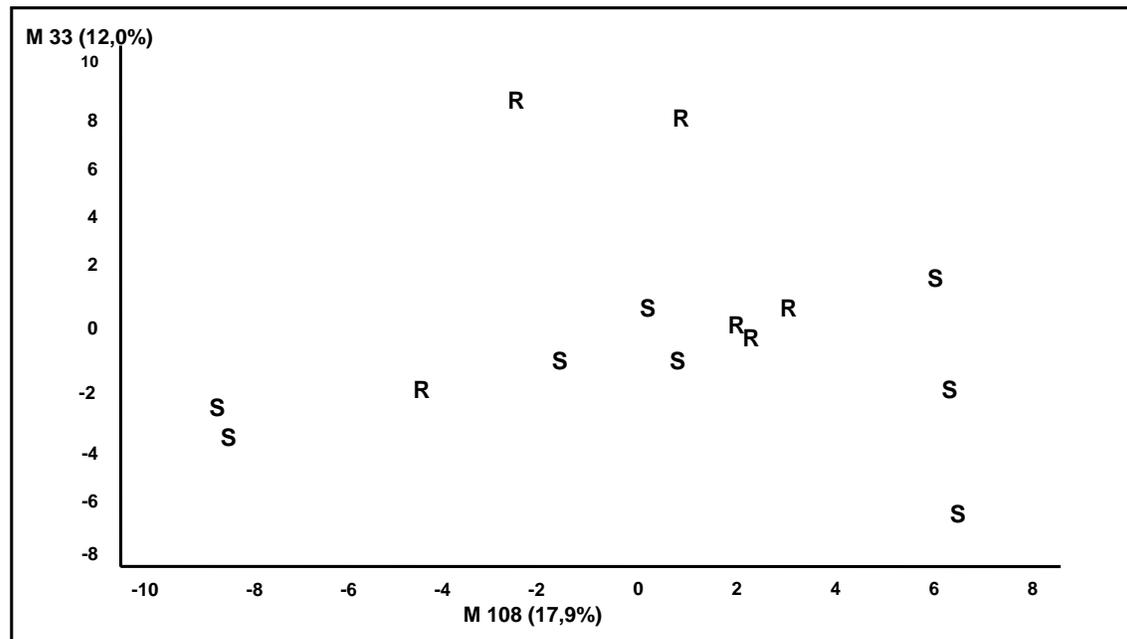


Figura 2 - Análise de componentes principais com 135 marcadores entre cordeiros Corriedale resistentes (R) e suscetíveis (S) naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais.

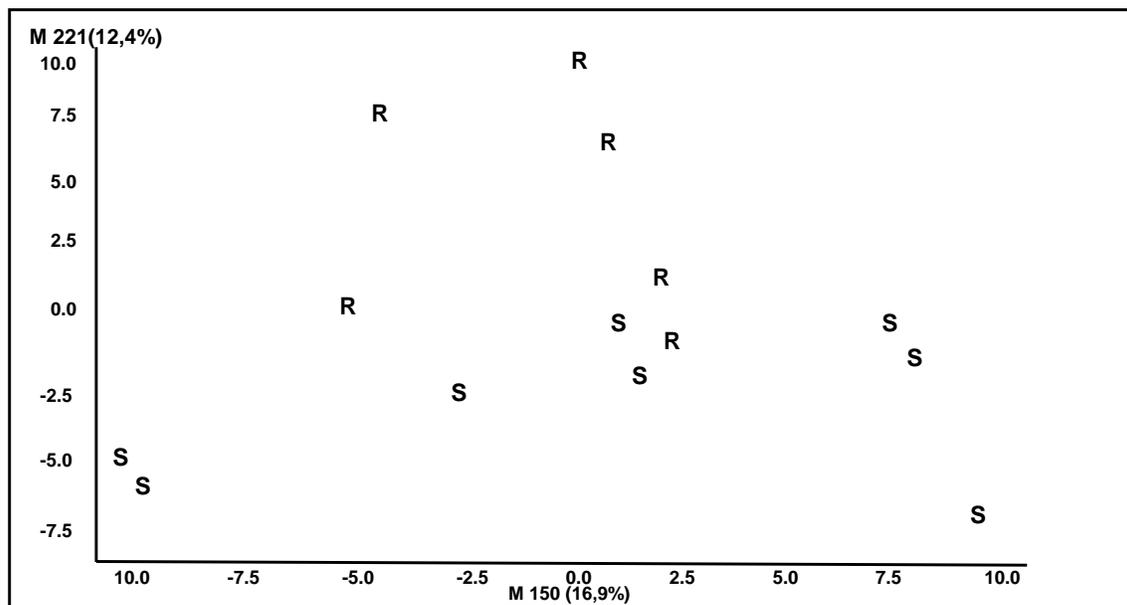


Figura 3 - Análise de componentes principais com 211 marcadores entre cordeiros Corriedale resistentes (R) e suscetíveis (S) naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais.

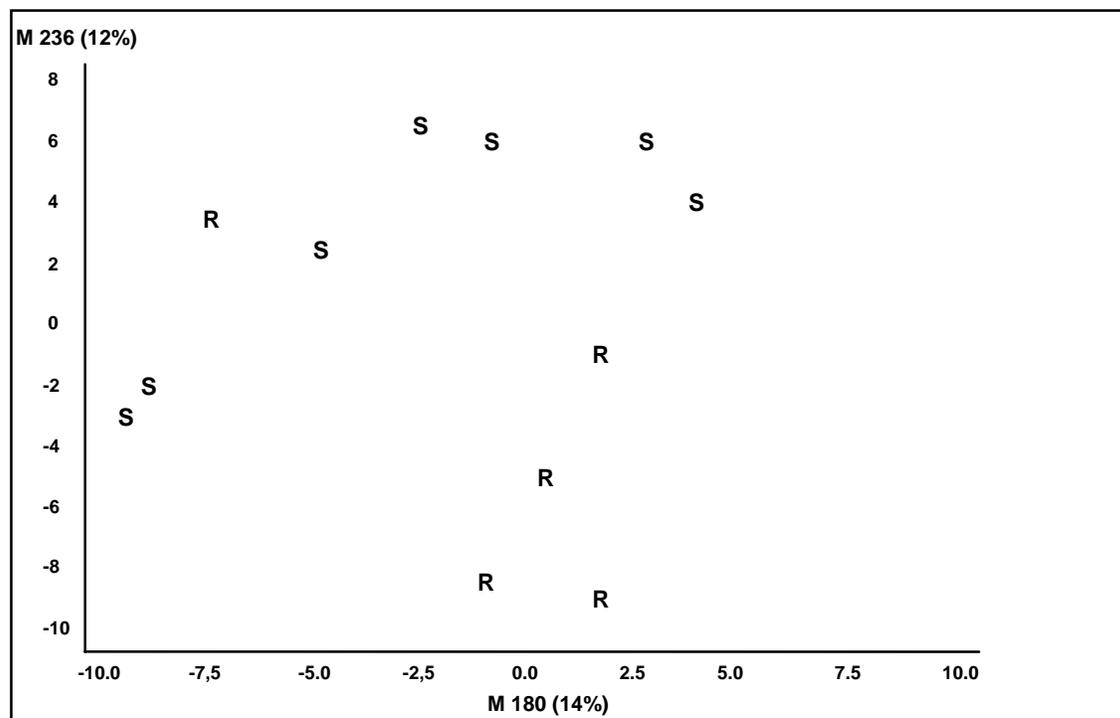


Figura 4 - Análise de componentes principais com 264 marcadores entre cordeiros Corriedale resistentes (R) e suscetíveis (S) naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais.

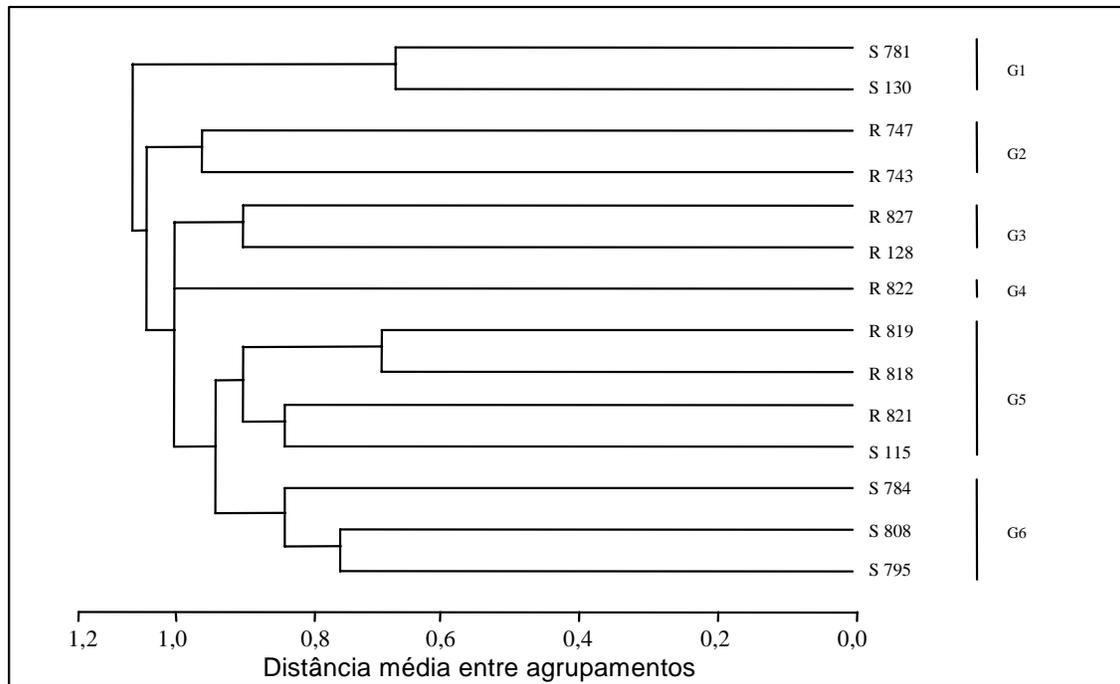


Figura 5 - Distância média entre cordeiros Corriedale resistentes (R) e suscetíveis (S) naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais, analisada a partir de 68 marcadores RAPD.

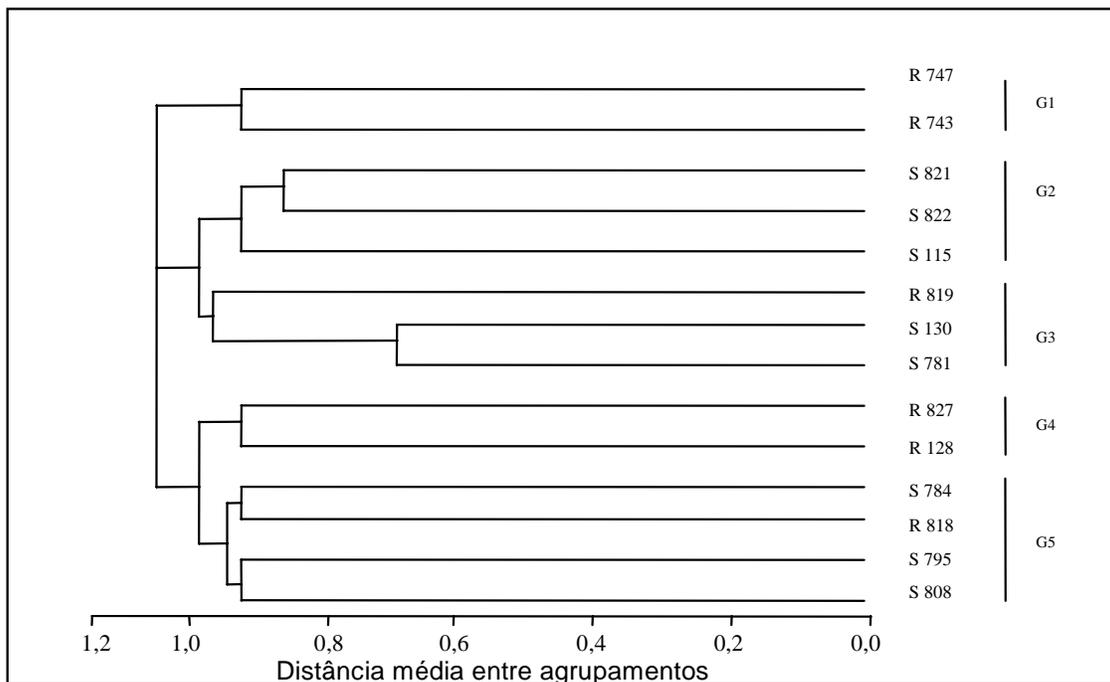


Figura 6 - Distância média entre cordeiros Corriedale resistentes (R) e suscetíveis (S) naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais, analisada a partir de 135 marcadores RAPD.

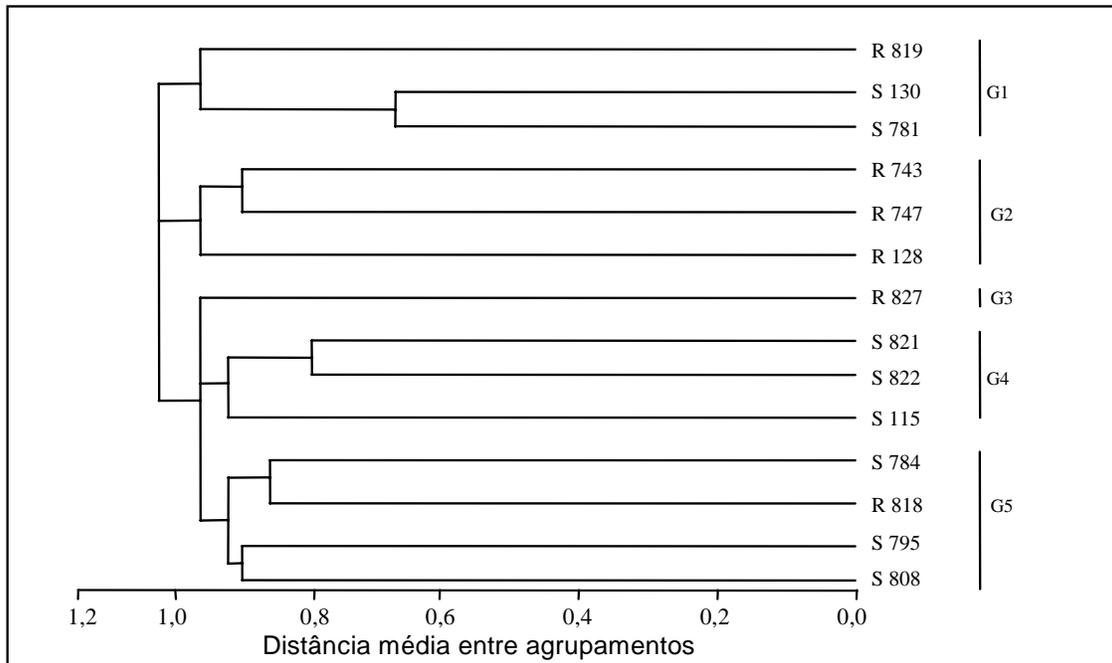


Figura 7 - Distância média entre cordeiros Corriedale resistentes (R) e suscetíveis (S) naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais, analisada a partir de 211 marcadores RAPD.

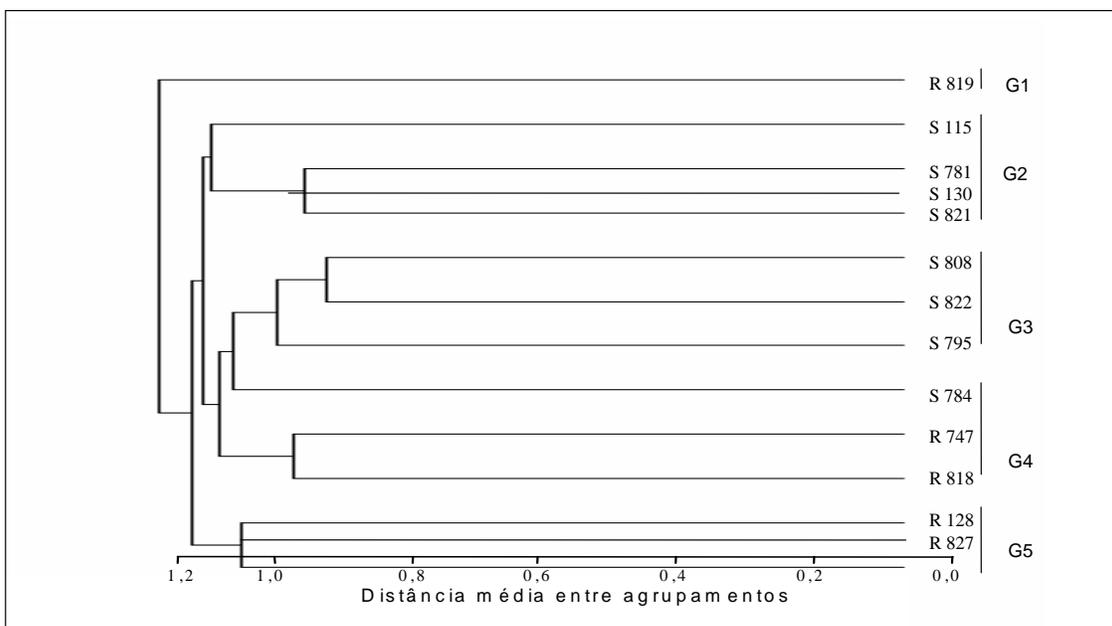


Figura 8 - Distância média entre cordeiros Corriedale resistentes (R) e suscetíveis (S) naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais, analisada a partir de 264 marcadores RAPD.

### DISCUSSÃO

Os cordeiros suscetíveis tiveram LogOPG médio 3 vezes maior que os normais, enquanto a relação desses com os resistentes chegou a mil vezes. Já a comparação dos valores médios observados entre o LogOPG dos Resistentes e dos Normais chegou a 400 vezes. Diferenças bem mais discretas

foram observadas por BUDDLE et al. (1992), MALCZEWSKI et al. (1994) e THAMSBORG et al. (1999), provavelmente por se tratarem de descendentes de animais previamente selecionados dentro de linhas. Fato a ser destacado é o menor valor médio dos OPG<sub>2</sub>, revelando o início do desenvolvimento de resistência adquirida. Além disso, a ausência de infecção nos animais Resistentes também pode ter contribuído com os

menores níveis de contaminação da pastagem, auxiliando na queda de mais de 40% nos valores dos OPGs no segundo desafio dos animais Normais e Suscetíveis. Os maiores valores do LogOPG<sub>1</sub> nos machos vai ao encontro da idéia de BARGER (1993), que atribui um efeito imunodepressor dos andrógenos na mediação celular dos cordeiros, enquanto os estrógenos das fêmeas agiriam de forma contrária. Por outro lado, no presente estudo, constatou-se que as diferenças dos valores médios de LogOPG entre os sexos foram diminuindo, a tal ponto que a análise de variância do OPG<sub>2</sub> não detectou efeito de sexo, mostrando que possíveis interferências hormonais vão sendo estabilizadas com o aumento da idade dos animais.

Não foram detectadas diferenças significativas nos ganhos de peso entre as classes fenotípicas avaliadas. Entretanto, no acompanhamento de cordeiros do nascimento aos 7 meses de idade, MALCZEWSKI et al. (1994) chegaram a observar um favorável ganho de 13 g dia<sup>-1</sup> nos animais com menores OPGs. Os distintos valores médios de LogOPGs entre as progênes de carneiros constata a existência de variabilidade nas respostas dos cordeiros frente aos parasitos, ou seja, da resistência aos endoparasitos dentro deste rebanho. SWAN & EADY (2003) descrevem uma variação de 22% na resistência a endoparasitos entre carneiros do mesmo rebanho.

A proporção de animais em cada uma das categorias representa uma distribuição normal dos indivíduos, concordando com os registros de STEAR & WAKELIN (1998). Já os parasitos, dentro da população ovina, encontravam-se em sobredispersão, tal como citado por WAKELIN (1984), KASSAI & SRÉTER (1992) e também comentado por CASTELLS (2003).

A magnitude das correlações fenotípicas encontradas neste estudo estão de acordo com os resultados publicados por STEAR et al. (1995). As correlações negativas entre OPG<sub>2</sub> e os pesos e ganhos de pesos demonstram um efeito pequeno sobre a variação destes, provavelmente pelo período curto de acompanhamento dos pesos, mas ainda assim leva a uma diminuição da produção, refletida em quilos de cordeiro. Resultados semelhantes foram encontrados por BAKER et al. (1990) e BOUIX et al. (1998), que observaram influência negativa do OPG sobre ganho de peso. De forma semelhante, McEWAN et al. (1992) e EADY et al. (1994), demonstram que os menores valores de OPG foram observados em animais pertencentes a linhas selecionadas para altos ganhos de peso.

Porcentuais de detecção do polimorfismo bem menores que os aqui encontrados foram registrados por CUSHWA & MEDRANO (1994) e CUSHWA et al. (1996). Uma vez que as constituições genéticas avaliadas no presente experimento eram oriundas de cordeiros com parentesco máximo de meio-irmãos, a técnica de RAPD produziu um número muito superior de fragmentos polimórficos em cada *primer* utilizado.

Nos agrupamentos, observa-se que alguns indivíduos ocorrem nos mesmos grupos (R747 e R743; S781 e S130), mesmo com um número crescente de marcadores analisados. Como não possuem o mesmo pai, possivelmente tenham semelhantes mecanismos de resistência e suscetibilidade aos parasitos, respectivamente. Nas análises com maior número de marcadores moleculares (211 e 264) podem ser observados cinco grupos em cada; onde alguns reúnem somente indivíduos resistentes e outros apenas suscetíveis. Animais destes grupos fenotípicos possivelmente têm diferenças genéticas associadas ao caráter resistência aos endoparasitos e podem ser usados em estudos futuros.

Na avaliação com 211 marcadores, entretanto, um conjunto de indivíduos aparece no mesmo grupo

consistentemente, porém agrega indivíduos com resposta diferenciada (R818, S784, S808 e S795). Isto sugere que o indivíduo R818 seja similar geneticamente aos suscetíveis em outros locos, podendo até compartilhar regiões oriundas de ascendentes em comum, porém apresente um mecanismo diferenciado de resistência, o qual não foi detectado no presente estudo. Isto é justificável, uma vez que a técnica de RAPD amplifica diferenças ao acaso e, nesta análise, não tenha sido suficientemente sensível para detectar tal diferença particular.

No aspecto marcadores moleculares, apesar de haver certa flutuação nos valores dos componentes principais, observa-se maior distinção dos grupos genéticos à medida que aumenta o número de marcadores utilizados nas análises. Isto demonstra que a utilização de uma quantidade superior a 250 possibilitou a exploração de outras regiões do genoma, portanto valores intermediários aos recomendados por BEATTIE (1994) e LESSA et al. (2003).

No conjunto total de marcadores RAPDs, ocorreram bandas invariáveis ou não polimórficas, às quais, embora não tenham contribuído diretamente na demonstração de variabilidade da resistência aos endoparasitos, podem ser usadas para determinar a variabilidade intra espécie (entre famílias, raças), e entre espécies, tais como entre ovinos e caprinos ou bovinos.

## CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética da característica resistência a endoparasitos dentro de rebanhos da raça Corriedale, sendo que a técnica de RAPD permite discriminar os indivíduos Resistentes e Suscetíveis estudados; e onde a utilização de um número superior a 250 marcadores é capaz de identificar maiores homologias e apresentar um melhor agrupamento dos indivíduos neste tipo de análise. A formação de grupos compostos somente por indivíduos resistentes e outros por suscetíveis indica que alguns marcadores estão correlacionados com a característica estudada e poderão ser potencialmente úteis em populações de mapeamento.

## REFERÊNCIAS

- BAKER, R.L.; WATSON, T.G.; BISSET, S.A. et al. Breeding Romney sheep which are resistant to gastro-intestinal parasites. In: CONFERENCE AUSTRALIAN ASSOCIATION OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS, 8., Hamilton and Palmerston North, New Zealand, 1990. **Proceedings...** Palmerston: CSIRO, 1990. p.173-178.
- BARGER, I.A. Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. **International Journal for Parasitology**, Cambridge, v.23, n.4, p.463-469, 1993.
- BEATTIE, C.W. Livestock genome maps. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, Cambridge, v.10, n.9, p.334-338, 1994.
- BEH, K.J.; MADDOX, J.F. Prospects for development of genetic markers for resistance to gastrointestinal parasite infection in sheep. **International Journal for Parasitology**, Marrickville, v.26, n.8/9, p.879-897, 1996.
- BONINO, J. Resistência anti-helmíntica de parasitos gastrintestinais em ovinos. In: CASTELLS, D.M. (Ed.) **Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos**. Buenos Aires: FAO, 2003. p.55-60.
- BOUIX, J.; KRUPINSKI, J.; NOWOSAD, B. et al. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Polish long-

- wool sheep. **International Journal for Parasitology**, Marrickville, v.28, n.11, p.1797-1804, 1998.
- BUDDLE, M.B.; JOWETT, G.; GREEN, R.S. et al. Association of blood eosinophilia with the expression of resistance in Romney lambs to nematodes. **International Journal for Parasitology**, Marrickville, v.22, n.7, p.955-960, 1992.
- CARDELLINO, R. La inclusión de la resistencia genética a parásitos gastrointestinales en programas de mejoramiento genético. In: CASTELLS, D.M. (Ed.) **Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos**. Buenos Aires: FAO, 2003. p.97-100.
- CARDELLINO, R.; ROVIRA, J. **Mejoramiento Genético Animal**. 1.ed. Montevideo: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., 1987. 253p.
- CASTELLS, D.M. Resistencia genética del ovino a los nematodos gastrintestinais (Revisión). In: CASTELLS, D.M. (Ed.) **Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos**. Buenos Aires: FAO, 2003. p.79-86.
- CASTELLS, D.M.; MEDEIROS, A.; LORENZELLI, E. et al. Diagnóstico de resistencia antihelmíntica de *Haemonchus* spp. a las ivermectinas en el Uruguay. In: CASTELLS, D.M. (Eds.) **Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos**. Buenos Aires, Argentina. FAO, 2003. p.61-66.
- CUSHWA, W.T.; MEDRANO, J.F. Identification of RAPD genetic markers in sheep. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph. **Proceedings...** Guelph, Canada: University of Guelph, 1994. v.21, n.5, p.133-136.
- CUSHWA, W.T.; DODDS, K.G.; CRAWFORD, AM. et al. Identification and genetic mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to the sheep genome. **Mammalian Genome**, New York, v.7, n.8, p.580-585, 1996.
- EADY, S.J.; WOOLASTON, R.R.; MORTIMER, S.I. Internal parasite resistance of Merino flocks selected for production. **Word Technology and Sheep Breeding**, Armidale, v.42, n.3, p.237-242, 1994.
- ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.; PINHEIRO, A.C. et al. The prevalence of antihelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, Cambridge, v.62, n.3-4, p.119-206, 1996.
- GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Council Science and Industrial Organization Research**, Victoria, v.12, n.1, p.50-52, 1939.
- GORTARI, M.T.de; FREKING, B.A.; KAPPES, S.M. et al. Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. **Animal Genetics**, Santa Clara, v.28, n.4, p.274-290, 1997.
- HORNG, Y.M.; HUANG, M.C. Male-specific band in random amplified microsatellite polymorphism fingerprints of Holstein cattle. **Proceedings of National Science Council of Republic China**, Pequim, v.24, n.1, p.41-46, 2000.
- KANTANEN, J.; VILKKI, J.; ELO, K. et al. Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting genetic variation. **Animal Genetics**, Santa Clara, v.26, n.5, p.315-320, 1995.
- KASSAI, T.; SRÉTER, T. Genetic aspects of host resistance to helminthic infections. **Research and Reviews in Parasitology**, Hamilton, v.52, n.3-4, p.67-75, 1992.
- LESSA, E.; WLASIUK, G.; TOMASCO, I. Herramientas y la genética molecular para el estudio de ovinos y sus parásitos. In: CASTELLS, D.M. (Ed.) **Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos**. Buenos Aires: FAO, 2003. p.117-121.
- MALCZEWSKI, A.; KRUPINSKI, J.; GRUNER, L. et al. Preliminary studies on genetic resistance or susceptibility of sheep to gastro-intestinal nematodes. **Acta Parasitologica**, Warszawa, v.39, n.1, p.25-28, 1994.
- McEWAN, J.C.; MASON, P.; BAKER, R.L. et al. Effect of selection for productive traits on internal parasite resistance in sheep. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, Wellington, v.52, n.1, p.53-57, 1992.
- McEWAN, J.C. **WormFEC™ Breeding sheep resistant to roundworm infection: BREEDERS' MANUAL**. New Zealand: AgResearch, Invermay. 1994. 33p.
- RAO, K.B.; BHAT, K.V.; TOTEY S.M. Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, Cambridge, v.13, n.5, p.135-138. 1996.
- ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, J.P. Methods for eggs count and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal Agricultural Research**, Melbourne, v.1, n.1, p.99-102, 1950.
- ROMERO, J.R. Que classe de desafio es el manejo integrado de parásitos en lanares? In: CASTELLS, D.M. (Ed.) **Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos**. Buenos Aires: FAO, 2003. p.25-31.
- SAS - **SAS User's guide: Statistical Analysis System Institute**. North Carolina: Carry, 1996. 890p.
- SHARMA, D.; APPA RAO, K.B.; TOTEY, S.M. Measurement of within and between population genetic variability in quails. **British Poultry Science**, Izatnagar, v.41, n. 1, p.29-32, 2000.
- STEAR, M.J.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J.L. et al. The distribution of faecal nematode egg counts in Scottish Blackface lambs following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. **Parasitology**, Cambridge, v.110, n.5, p.573-581, 1995.
- STEAR, M.J.; WAKELIN, D. Genetic resistance to parasitic infection. **Reviews Science Technology International**, v.17, n.1, p.143-153, 1998.
- SWAN, A.; EADY, S. Breeding for parasite resistance in Australian Merinos. In: CASTELLS, D.M. (Ed.) **Resistencia genética del ovino y su aplicación en sistemas de control integrado de parásitos**. Buenos Aires: FAO, 2003. p.91-95.
- THAMSBORG, S.M.; GRAY, G.D.; GILL, H.S. et al. The intramammary inflammatory response of genetically resistant Merino ewes infected with *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, Marrickville, v.29, n.3, p.451-458, 1999.
- WAKELIN, D. Evasion of the immune response: survival within low responder individuals of the population. **Parasitology**, Cambridge, v.88, n.5, p.639-657, 1984.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification **Genomics**, Oxford, v.20, n.2, p.176-183, 1994.