



Razas Andaluza y Catalana

2. OBJETIVOS

Generales:

El principal objetivo de esta tesis es el de sentar las bases de los futuros programas de conservación y mejora de las razas asnales españolas, para así mantener la máxima cantidad de diversidad genética con el mínimo incremento de consanguinidad posible por generación. En esta tesis se plasman los estudios genéticos (nuclear y mitocondrial) realizados en dichas razas. No obstante, el proyecto original es más amplio y contempla además: la caracterización fenotípica (morfológica) de las razas, calculando para ello una serie de índices zoométricos; la caracterización hematológica y bioquímica clínica, que permita establecer los rangos de referencia y de normalidad en esta especie, y la caracterización citogenética (polimorfismos cromosómicos).

Específicos:

- ✚ Estudiar los niveles de variabilidad genética de las poblaciones, a través del análisis de marcadores de ADN del tipo microsatélite, originalmente diseñados para caballos.

- ✚ Identificación genética de los individuos, tanto para la programación de apareamientos y análisis de paternidades, como para la posible asignación de individuos a raza; todo ello enmarcado dentro de la gestión de los futuros programas de conservación.

- ✚ Analizar la estructura genética de las poblaciones, que nos permita además obtener valores promedio de consanguinidad en las mismas.

- ✚ Analizar el grado de divergencia genética que existe entre las razas: estudio de las relaciones filogenéticas.

- ✚ Estudiar el polimorfismo genético del ADNmt, y analizar la variabilidad genética a este nivel.



Raza Mallorquina

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 **Material biológico:**

Para los estudios con microsatélites (ADN nuclear), el número de individuos y razas involucradas correspondieron a: 87 asnos Andaluces (AND), 140 Catalanes (CAT), 104 Mallorquines (MALL), 74 asnos de las Encartaciones (ENC) y 108 Zamorano-Leoneses (ZAM). La principal área de distribución de estas razas se aprecia en la Figura 5. Adicionalmente se analizaron 9 individuos de la raza asnal de Marruecos (MOR), que nos sirvió como población de referencia debido a que son genuinos representantes del *Equus asinus africanus*, y 24 caballos de la raza Merens, los cuáles fueron utilizados como población “outgroup”. Para el análisis jerárquico de las poblaciones de asnos españoles se procedió a dividir las 5 razas en 16 subpoblaciones, de acuerdo a criterios geográficos y/o áreas de influencia de ciertos criadores. Esta subdivisión “a priori” de las razas en subpoblaciones se puede apreciar en la Tabla 4 y Figura 6.

3.2 **Extracción de ADN:**

El ADN genómico se extrajo a partir de glóbulos blancos (leucocitos) de muestras sanguíneas obtenidas de los 513 asnos españoles antes descritos y siguiendo para ello la metodología de Ausubel *et al.* (1987). El método consistió en sucesivos lavados de 200 µl de sangre entera con 500 µl de un tampón salino TE (Tris-HCl 10 mM y 1 mM EDTA, pH=8).

Después de 3 ó 4 lavados con TE, el precipitado de glóbulos blancos fue resuspendido en 100 µl de un tampón de digestión K (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, Tween 20 0.5%) el cuál contenía un detergente, capaz de lisar la membrana de los leucocitos, y 1 µl de la

enzima proteinasa K (10 mg/ml) que impide que las nucleasas citoplasmáticas degraden el ADN, incubándose posteriormente durante 1 hora a 57 °C.



Figura 5. Localización geográfica de las razas asnales españolas.

Una vez culminada la incubación, se separó el ADN de las proteínas y demás componentes del lisado celular, añadiendo 400 µl de una mezcla de solventes orgánicos (fenol:cloroformo:alcoholisoamílico en una proporción 25:24:1). Esta mezcla se agitó y centrifugó durante 5 min. a 13.000 rpm, quedando el ADN resuspendido en la fase acuosa y las proteínas y demás componentes en la fase orgánica. A este producto, extraído del solvente, se le añadieron 20 µl (1/10 volúmenes) de cloruro sódico 2 M y 500 µl (2.5 volúmenes) de etanol, siendo la finalidad de este último la de eliminar las sales que contaminan el precipitado. El ADN precipita de manera visible y forma un “algodón” el cuál es transferido a un eppendorf que contiene 500 µl de etanol al

70%, se centrifuga y se retira el sobrenadante. Finalmente, el precipitado de ADN se resuspende con TE o agua mili-q en un volumen que oscila entre 50 y 200 μ l y se guarda hasta su posterior análisis a -4 °C.

Tabla 4. Descripción poblacional de las 5 razas de asnos españoles analizadas.

Raza	Número	Subpoblación	Número de animales muestreados
Andaluza	87	AND1	33
		AND2	28
		AND3	26
Catalana	140	CAT1	55
		CAT2	71
		CAT3	14
Mallorquina	104	MALL1	24
		MALL2	42
		MALL3	17
		MALL4	21
Encartaciones	74	ENC1	22
		ENC2	23
		ENC3	29
Zamorano-Leonesa	108	ZAM1	58
		ZAM2	22
		ZAM3	28
Asno de Marruecos	9		9
(<i>E. a. africanus</i>)			
Merens (<i>E. caballus</i>)*	24		24

* Utilizado como outgroup

3.3 Marcadores microsatélites:

De los 15 microsatélites utilizados para el análisis, 12 de ellos se encuentran incluidos en un kit comercial para paternidades en caballos (Stocks-Marks TM for Equine Paternity; Applied Biosystems División, Perkin Elmer Cetus; Norwalk, CT, USA), y correspondieron a los microsatélites: AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, y VHL20

Los otros 3 restantes (HMS1, HMS5 y HTG15) fueron obtenidos de la literatura, considerando para su elección que amplificasen exitosamente en caballos y que fuesen muy polimórficos (Breen *y col.*, 1994). Para hacerlos funcionales en las muestras de asnos se realizaron ligeras modificaciones en las condiciones de PCR. Las secuencias de los “*primers*”, así como otras características de los mismos, se aprecian en la Tabla 5.

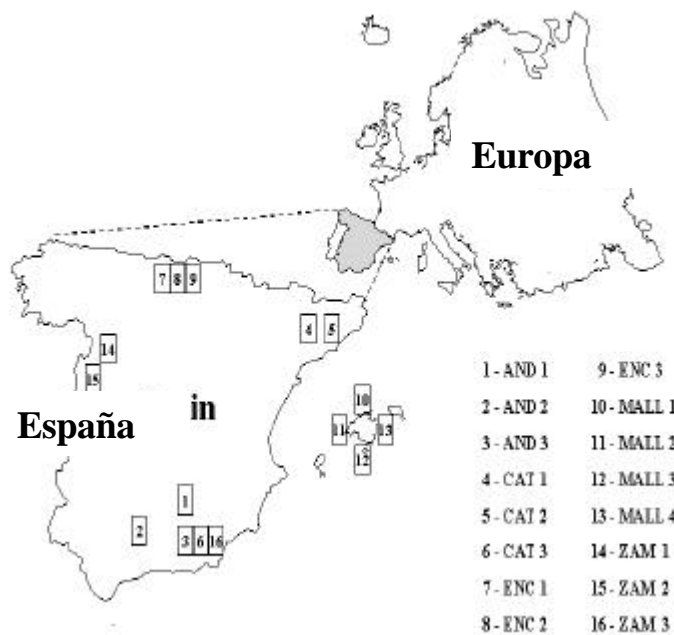


Figura 6. Localización geográfica de la subpoblaciones asnales españolas y su código de referencia.

3.4 **Condiciones de la PCR**

Los 15 microsatélites, marcados fluorescentemente, se amplificaron en tres múltiplex, con el objeto de evitar el solapamiento entre los productos originados en la PCR.

La primera múltiplex incluyó los microsatélites ASB2, HMS3, HMS6, HTG6, HTG10 y VHL20; la segunda estuvo compuesta por los marcadores AHT4, AHT5, HMS2, HMS7 y HTG7 y la tercera contenía a los marcadores HMS1, HMS5, HTG4 y HTG15. Todas las PCR múltiplex fueron amplificadas en una reacción final de 15 μ l, conteniendo 30 ng de ADN genómico, 200 μ M de desoxirribonucleótidos (dNTP), 0.5 μ l de ADN polimerasa (AmpliTaq gold, 5U/ μ l), 1.5 μ l de cada “*primer*” (AHT4, ASB2, HMS2, HMS3, HTG6, HTG7, HTG10), 0.4 μ l de los “*primers*” (AHT5, HMS6, y HMS7) y solo 0.3 μ l del “*primer*” VHL20; todos ellos pertenecientes al kit comercial (por lo que las concentraciones no están disponibles) y 0.20 μ M de los marcadores HMS1, HMS5, HTG4 y HTG15.

La PCR fue llevada a cabo en un termociclador 9700 (GeneAmp PCR system PE) comportando una primera etapa de activación de la polimerasa a 95°C durante 10 min., seguido de 30 ciclos que comprendían, una primera fase de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, una fase de hibridación a 60°C durante 30 segundos y una fase de extensión de la cadena a 72°C durante 60 segundos. El programa térmico finalizó con una extensión a 72°C durante 60 minutos.

Tabla 5. Secuencias de los “primers” utilizados y su ubicación en el mapa equino.

Marcador	ECA¹	Secuencias de “primers” (5’----3’)	Referencia
AHT4	24q14	F:[FAM] AACGCCTGAGCAAGGAAGT R: GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	Binns y col.(1995)
AHT5	8	F:[JOE] ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC	Binns y col.(1995)
ASB2	15 _{q21-q23}	F:[JOE] CCATTCCCGCCCCACCCCGGCA R:CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	Breen y col.(1997)
HMS1	15	F:[TAMRA] CATTCTTCATGTCTGCTTGG R:TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC	Guerin y col.(1994)
HMS2	10	F:[TAMRA]CTTGACAGTCGAATGTGTATTAATG R:GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC	Guerin y col.(1994)
HMS3	9	F:[TAMRA] CCAACTCTTTGTACATAACAAGA R:CCATCCTCACTTTTCACTTTGTT	Guerin y col.(1994)
HMS5	5	F:[TAMRA]TAGTGTATCCGTCAGAGTTCAAAG R:GCAAGGAAGTCAGACTCCTGGA	Guerin y col.(1994)
HMS6	4	F:[JOE] GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG R: CTCCATCTTGTAAGTGTAACCTCA	Guerin y col.(1994)
HMS7	1	F:[TAMRA] CAGGAACTCATGTTGATACCATC R:TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	Guerin y col.(1994)
HTG4	9	F:[FAM] CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R:CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCT	Ellegren y col.(1992)
HTG6	15 _{q26-27}	F:[JOE] CCTGCTTGAGGCTGTGATAAGAT R:GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT	Ellegren y col.(1992)
HTG7	4	F:[TAMRA]CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R:ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	Marklund y col.(1994)
HTG10	21	F:[JOE] CAATTCCCGCCCCACCCCGGCA R:TTTTTATTCTGATCTGTACATTT	Marklund y col.(1994)
HTG15	5	F:[JOE] TCCTGATGGCAGAGCCAGGATTTG R:AATGTCACCATGCGGCACATGACT	Bailey y col.(1994)
VHL20	30	F:[FAM] CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R:AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	Van Haeringen y col. (1994)

¹ *Equus caballus* Autosoma

Los productos de la PCR fueron posteriormente detectados mediante electroforesis capilar, utilizando un secuenciador automático (ABI, Applied Biosystems 310 DNA sequencer), y analizados con el programa GENESCAN (analysis software ABI) usando el marcador ROX 350 pb como marcador interno estándar de tamaño (Figura 7).

3.5 Análisis estadísticos

3.5.1 Variabilidad genética

Los análisis de variabilidad genética se realizaron a partir de las frecuencias alélicas, obteniéndose los valores de los diferentes estadísticos mediante el programa BIOSYS-2 (Swofford y Selander, 1999). El test de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) de las frecuencias genotípicas, fue llevado a cabo, utilizando el test exacto del programa GENEPOP 3.1d (Raymond y Rousset, 1995), usando el método de la cadena de Markov (Guo y Thompson, 1992).

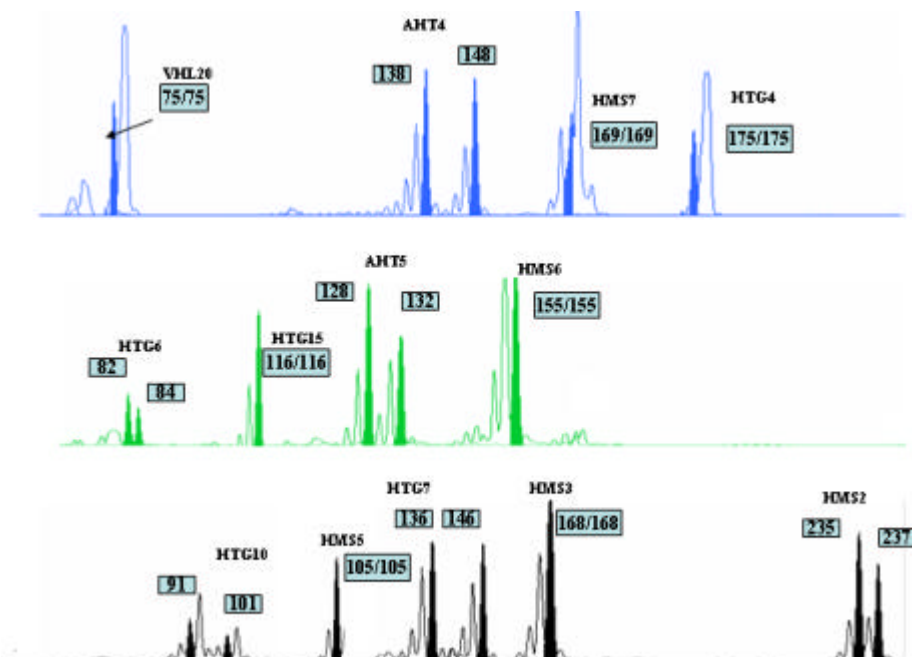


Figura 7. Electroferograma de la leyenda de los microsatélites (ABI 310).

El contenido de información polimórfico (PIC) fue calculado para cada uno de los marcadores según lo descrito por Botstein *y col.* (1980) y la probabilidad de exclusión (PE) fue calculada, tanto de forma individual, como para el conjunto de los marcadores según lo descrito por Jamieson (1994), tanto para la población como un conjunto, como para cada una de las razas en forma particular.

El promedio de heterocigosidad esperada para cada población (H_s) así como la diversidad génica para el total de la población (H_T) y la diversidad génica entre poblaciones, el llamado coeficiente de diferenciación génica G_{ST} (Nei, 1973), fueron estimados usando el programa computacional DISPAN (Ota, 1993) y testados mediante tests permutacionales. Las diferencias en las heterocigosidades medias entre razas fueron determinadas mediante análisis de varianza (ANOVA test) con el paquete estadístico SAS[®] (SAS, 1996).

3.5.2. Estructura de la población

La estructura de la población fue analizada a través del estudio de los F -estadísticos, utilizando el método descrito por Weir y Cockerham (1984) e implementado en el programa computarizado FSTAT (Goudet, 2000). Para el estudio jerárquico de la población (intra-racial) se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) incorporado en el programa computarizado ARLEQUIN 2.000 (Schneider *y col.*, 2000). AMOVA permite las estimaciones de estructura de la población a diferentes niveles jerárquicos específicos.

Para realizar los tests de significancia de los diferentes estadísticos, y así testar la hipótesis nula de “no diferenciación” en los correspondientes niveles jerárquicos, se realizaron remuestreos y análisis permutacionales del tipo *jackknifing* y *bootstrapping*, mediante los programas previamente mencionados. La tasa efectiva de migración

génica fue analizada mediante el método de Slatkin (1993), implementado en el programa GENEPOP ($M = N_e m$, siendo M el número promedio de migrantes que se intercambian por generación).

3.5.3 Distancias y relaciones filogenéticas

Las distancias genéticas y los árboles filogenéticos entre poblaciones se obtuvieron en primer lugar a partir de la distancia D_A (Nei y col., 1983). Takezaki y Nei (1996) sugirieron el uso de esta medida en los análisis con marcadores del tipo microsatélite, cuando el principal objetivo del estudio está enfocado a la correcta asignación de la topología, más que a estudios de tiempos evolutivos. Las distancias fueron analizadas con el método de agrupamiento neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987). Dado que este método sólo produce árboles no rotados, se incluyó en el estudio a la raza equina Merens, como población outgroup permitiendo así dar una orientación filogenética al árbol. La robustez del dendrograma fue evaluada por re-muestreos bootstrap, de los *loci*, con un total de 1.000 replicaciones. Todos los cálculos se realizaron utilizando el paquete DISPAN (Ota, 1993).

Por otra parte se calculó la distancia genética de Reynolds (Reynolds y col., 1983) entre poblaciones. Esta medida se basa en los valores F_{ST} [$D_L = -\ln(1 - F_{ST})$]. La distancia de Reynolds, conjuntamente con el método de agrupamiento NJ, se utilizó para construir el dendrograma y analizar las relaciones existentes entre razas, usando para ello el programa PHYLIP (Felsenstein, 1995). Se obtuvo un árbol de consenso no rotado, evaluado mediante 1.000 replicaciones bootstrap.

Adicionalmente, ya que las distancias genéticas pueden ser utilizadas como medidas de diversidad genética, según lo propuesto por Weitzman (1992, 1993), se realizaron aproximaciones para proveer una representación jerárquica adicional de las razas y además evaluar la

posible pérdida marginal de diversidad, dados diferentes patrones de extinción de las razas, tal y como propusieron Thaon d' Arnoldi *y col.* (1998).

Para realizar dicha aproximación se calcularon las distancias genéticas entre las razas a partir de las frecuencias alélicas de las mismas. Las distancias utilizadas fueron: la distancia de Reynolds (Reynolds *y col.*, 1983) y la distancia estándar de Nei, corregida para pequeños tamaños de muestra (Nei, 1978).

Otras metodologías, tales como el análisis de los componentes principales (PCA), el cuál se realizó mediante el uso del paquete estadístico SAS en su procedimiento PRINCOMP (SAS, 1996) de acuerdo a las recomendaciones de Cavalli-Sforza *y col.* (1994), y el análisis de los alelos compartidos (Bowcock *y col.*, 1994), también fueron utilizadas para así analizar la diversidad genética entre las razas. Para este último se construyó un árbol con la metodología NJ, usando en este caso a cada animal de forma individual como unidad taxonómica operativa (OTU), a partir de una matriz de distancias derivada del estadístico de los alelos compartidos. Esta matriz se obtuvo utilizando el programa computarizado MICROSAT (Minch *y col.*, 1995), y a partir de ella se confeccionó un árbol NJ mediante el paquete estadístico PHYLIP (Felsenstein, 1995).

3.5.4 Asignación de individuos a raza

Los cálculos para la correcta asignación de individuos a sus poblaciones se llevaron a cabo mediante el programa GENECLASS (Cournuet *y col.*, 1999), el cuál tiene en cuenta diferentes métodos de estimación.

3.6 Análisis del ADN mitocondrial

En el caso de los estudios del ADN mitocondrial de los asnos españoles hay que realizar algunos comentarios adicionales, dadas sus particulares diferencias con el ADN nuclear (microsatélites). Estos son:

Individuos muestreados:

Se extrajo ADN total (tanto genómico como mitocondrial), mediante el método anteriormente descrito, a un total de 91 asnos para los estudios de la región D-loop y de 79 individuos para la región del citocromo b. La distribución de los animales muestreados por razas se aprecia en la Tabla 6.

Tabla 6. Razas asnales, número de individuos analizados para la secuenciación de la región del D-loop y el citocromo b.

Raza	Nº de animales analizados	
	D-loop	Cit b
<u>Españolas</u>		
Andaluza	20	18
Catalana	10	12
Encartaciones	11	7
Mallorquina	10	7
Majorera	10	10
Zamorano-Leonesa	10	7
<u>Africanas</u>		
Marruecos	9	7
Zimbabwe	11	11
Total	91	79

Solo comentar que además de las cinco razas estudiadas con los microsatélites, fueron incluidas para estos análisis muestras de la raza asnal española Majorera (MAJ) y 11 individuos del Asno de Zimbabwe (ZIM); estos últimos cedidos por A. Beja-Pereira, de la Unidad de Genética Animal y Conservación de la Universidad de Porto (Portugal), los cuáles fueron considerados como genuinos representantes del *E. a. somaliensis*. La secuencia del *E. caballus* fue usada como población outgroup y la misma fue recuperada del GenBank acceso nº X93337.

PCR y secuenciación de la región D-loop

Los “*primers*” (oligonucleótidos) para la PCR de la región hipervariable del D-loop, localizada entre el tRNO^{Pro} y la larga secuencia central conservada, fueron diseñados en base a la secuencia del ADN mitocondrial almacenada en el GENBANK (Xu y *col.*, 1996).

Estas secuencias amplificaron un fragmento de 383 pb, específicamente entre los sitios nucleotídicos 15387 y 15769 (Figura 8). Las secuencias de los “*primers*” diseñados corresponden a: viz. Donk A (5'-CCC AAG GAC TAT CAA GGA AG-3') y Donk B (5'-TTG GAG GGA TTG CTG ATT TC-3').

La PCR fue llevada a cabo en una reacción final de 20 µl, conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 20 µM dNTPs, 10 pmol de cada uno de los “*primers*”, 0.2 U AmpliTaq gold (PE Applied Biosystems, MA) y 50 ng de ADN molde. El ciclo térmico fue comportado en un termociclador 9700 (Thermal cycler PE), con el siguiente patrón: 94 °C por 10 min, seguido de 25 ciclos, cada uno consistía de 94 °C por 45 s, 60 °C por 45 s y 72 por 45 seg y una extensión final a 72 °C por 20 min.

Los productos originados de la PCR fueron purificados mediante la técnica de geles, previa a la reacción de secuenciación, usando el kit de extracción (Q/Aquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Una vez purificado el ADN se secuenció utilizando un kit comercial de secuenciación (ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing kit; Applied Biosystems Division, Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA, USA) utilizando, así mismo, el protocolo recomendado por la compañía manufacturera. Las secuencias del ADN asnal fueron determinadas utilizando un secuenciador automático (ABI Prism 310 DNA sequencer) y analizadas con el software GENESCAN de secuenciación (Applied Biosystems).

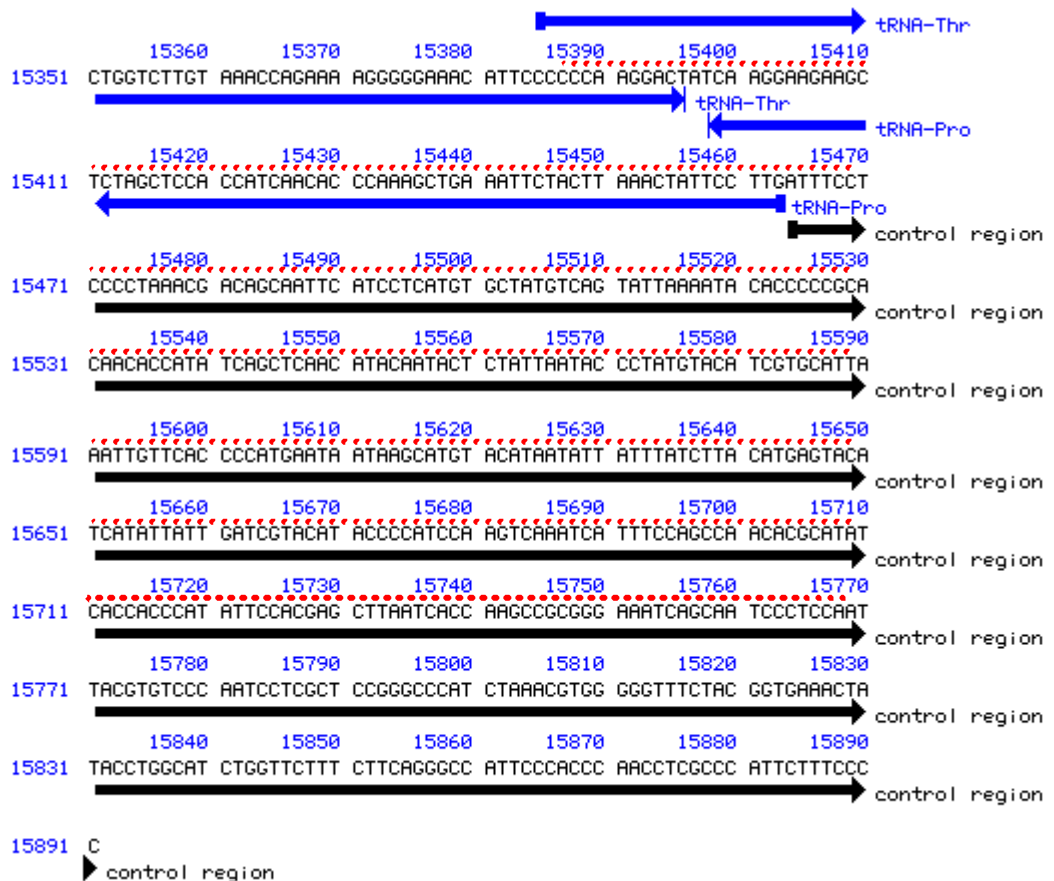


Figura 8. Región D-loop, entre los nucleótidos 15387 y el 15769, secuenciada en las razas asnales.

PCR y secuenciación de la región del citocromo b

Una región parcial del citocromo b, de 312 pb, fue amplificada y secuenciada específicamente entre los nucleótidos 14391 y 14703 (Xu y col., 1996; Figura 9) mediante la técnica de la PCR. Las condiciones de PCR fueron similares a las descritas previamente para el D-loop. Las secuencias de los “*primers*” correspondieron a: CITB-F (5'-CTG CCG AGA CGT TAA CTA C-3') y CITB-R (5'-GGC TTT GTC TAC TGA GAA TC-3'). Los productos de la PCR fueron, al igual que la región anterior, purificados mediante la técnica de geles y secuenciados con la técnica del “Big Dye terminator” en un ABI 310 Prism (Perkin- Elmer, Applied Biosystems).

Análisis estadísticos

Algunas de las secuencias del ADN mitocondrial han sido depositadas en el GenBank (accesos Nos. AF380130-380135 y AF416594-416599). Dichas secuencias, tanto la del mtDNA D-loop como la del citocromo b fueron alineadas usando el programa de alineamientos múltiples Clustal-X (Thompson y col., 1997) obteniéndose las diferentes secuencias existentes (haplotipos) y sus respectivas frecuencias.

Diversidad molecular

Una vez obtenidos todos los haplotipos, se procedió a evaluar el grado de diversidad en cada una de las razas en general, así como, la posible estructura genética de la población.

Se analizó entonces la diversidad haplotípica (h; Nei y Tajima, 1981), siendo esta medida análoga a la heterocigosidad esperada o diversidad génica de Nei en el ADN nuclear.

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right);$$

donde k = número de diferentes haplotipos y p_i representa a las frecuencias de cada i haplotipo.

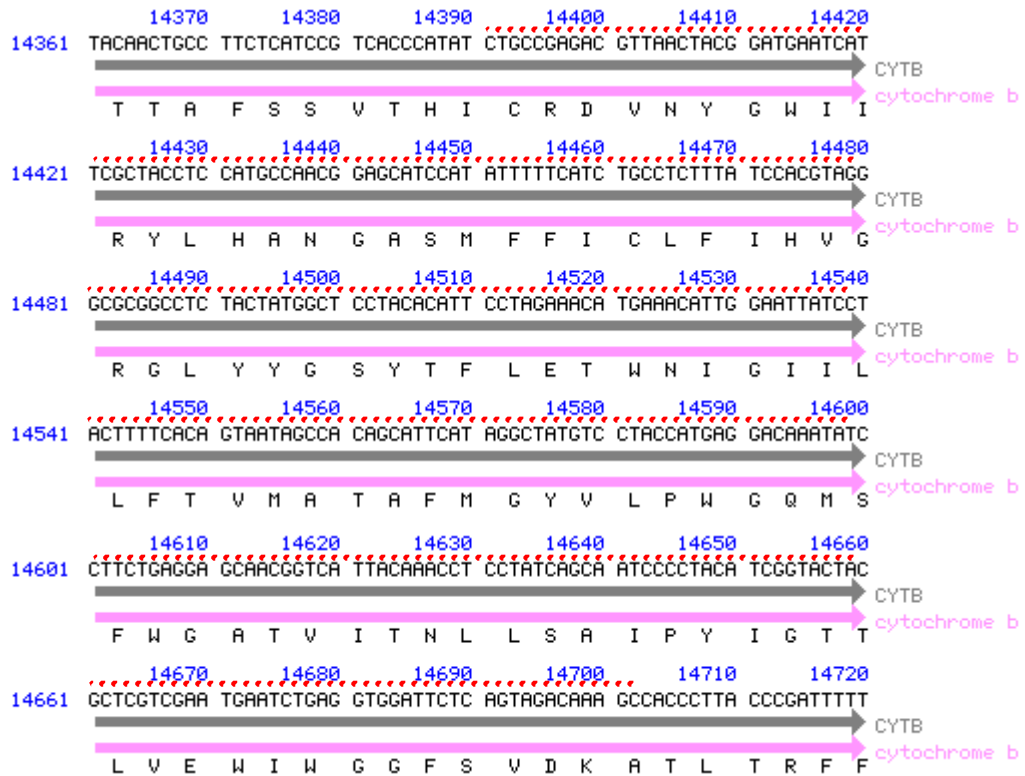


Figura 9. Región Citocromo b, entre los nucleótidos 14391 y 14703, secuenciada en las razas asnales.

Una segunda medida de variabilidad es la denominada diversidad nucleotídica (π ; Nei, 1987), definida como el número medio de diferencias nucleotídicas por *locus* entre las diferentes secuencias y se calcula a partir de:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} p_i p_j \delta_{ij};$$

donde δ_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre los haplotipos i y j .

La proporción de nucleótidos diferentes entre haplotipos (δ_{ij}) fue estimada a partir de la distancia de Tamura y Nei (1993), y todo ello analizado mediante la utilización del programa ARLEQUÍN (Schneider y *col.*, 2000).

El número medio de sustituciones nucleotídicas por posiciones entre dos grupos de secuencias (d_{XY}), que nos da una estimación de la distancia genética entre estos grupos (Nei y Li, 1979), fue calculada a partir de la fórmula:

$$d_{XY} = \pi_{12} = \sum_i \sum_j p_{1i} p_{2j} \delta_{ij}$$

donde δ_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre los haplotipos i y j , siendo p_i la frecuencia del haplotipo i .

Y a partir de ésta, y con la corrección por las divergencias, dado un grupo de secuencias, podemos calcular (d_A) a partir de:

$$d_A = \pi_{12} - \frac{\pi_1 + \pi_2}{2}$$

La distancia propuesta por Tamura y Nei (1993), es una de las que más se ajusta a la realidad, ya que considera una tasa mutacional diferente entre transiciones (α) y transversiones (β); así como, los cambios transicionales entre purinas (α_1) y entre pirimidinas (α_2) ya

que los mismos presentan tasas diferentes, y también pondera la frecuencia de cada una de las bases (Figura 10).

La divergencia de las secuencias (K) y su error estándar, así como, los análisis filogenéticos fueron realizados utilizando el programa informático MEGA (Kumar y col., 2001).

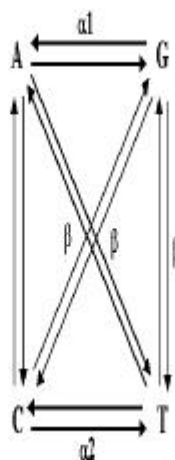


Figura 10. Modelo de sustitución nucleotídica de Tamura y Nei.

El árbol filogenético fue construido usando el algoritmo NJ y la confianza estadística de cada nodo fue estimada sobre 1000 réplicas bootstrap utilizando los programas MEGA y ARLEQUÍN; la secuencia del caballo (*E. caballus*), secuencia H1, cuyo número de acceso es el n^o X93337 (Ishida y col., 1994), fue utilizada como outgroup.

Para la estimación de la divergencia nucleotídica entre las poblaciones (d_A), se asumió una tasa de sustitución nucleotídica por sitio y año (λ) de la región del D-loop de $2-4 \times 10^{-8}$ (Ishida y col., 1995). A partir de la ecuación de Nei (1987), donde $d_A = 2\lambda t$; se estimó el

tiempo de divergencia (t, en años) entre las secuencias de asnos y la del caballo.

Minimum Spanning tree

Este tipo de reconstrucción filogenética se basa en un algoritmo similar al de parsimonia y elabora un árbol a partir de los haplotipos, utilizados estos como nodos intermedios y no como terminaciones, a pesar de que algunos OTU's (haplotipos) se puedan situar al final de la rama. Las principales diferencias y/o semejanzas referidas a las relaciones genéticas están definidas por el número de cambios nucleotídicos. Un "minimum spanning tree" (Prim, 1957), basado en el número de nucleótidos diferentes entre cada par de haplotipos, fue obtenido usando el programa MST del paquete informático NTSYS (Rohlf, 2001).