

VÍNCULOS DE PARENTESCO POR VÍA MATERNA ENTRE LOS ÚLTIMOS  
DESCENDIENTES DE LA ETNIA KAWÉSQAR Y ALGUNOS ENTIERROS EN LOS CANALES  
PATAGÓNICOS: EVIDENCIA DESDE EL ESTUDIO DE LINAJES MITOCONDRIALES

MAURICIO MORAGA\*, MICHELLE DE SAINT PIERRE\*\*, FRANCISCO TORRES\*\*\*, JUAN RÍOS\*\*\*

RESUMEN

El presente trabajo presenta los resultados obtenidos del estudio de polimorfismos de ADN mitocondrial de muestras esqueléticas de origen Kawésqar provenientes de los sitios isla Englefield, Cueva de la Cruz, isla Capitán Aracena y canal Maule; y de individuos vivos pertenecientes a la etnia Kawésqar. Los resultados obtenidos muestran una gran similitud entre las secuencias de ADN mitocondrial de los individuos vivos y las muestras antiguas. La comparación con otras secuencias publicadas para poblaciones aborígenes sudamericanas confirma los resultados y sugiere fuertemente que existe un vínculo de parentesco por vía materna entre las muestras y los Kawésqar actuales.

**PALABRAS CLAVES:** ADN antiguo, ADN mitocondrial, cazadores recolectores marinos, haplogrupos amerindios, Kawésqar.

KINSHIP BY MATERNAL VIA BETWEEN THE LAST DESCENDANTS OF  
KAWÉSKAR ETHNICITY AND BURIALS IN THE PATAGONIAN CHANNELS:  
EVIDENCE FROM THE STUDY OF MITOCHONDRIAL LINEAGES

ABSTRACT

This work presents the results obtained from mitochondrial DNA study of Kawésqar skeletal samples from Englefield island, Cueva de la Cruz, Captain Aracena island and Canal Maule-1; and living individuals of Kawésqar group. The results show a great similarity between the mitochondrial DNA sequences of both living individuals and the old samples. The comparison with other published sequences for south American aboriginal populations confirms the results and strongly suggests that there is a maternal kinship between the samples and the current Kawésqar.

**KEYWORDS:** ancient DNA, mitochondrial DNA, marine hunter-gatherer, amerindian haplogroups, Kawésqar.

\* Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. mmoraga@med.uchile.cl

\*\* Instituto de Ecología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. michelle.desan@gmail.com

\*\*\* Laboratorio de Criminalística Central, Policía de Investigaciones de Chile, Santiago, Chile. jrjosh@investigaciones.cl

## INTRODUCCIÓN

El estudio del ADN mitocondrial ha permitido en estos últimos años aproximarse con sorprendente detalle a las rutas migratorias que han seguido los humanos desde su salida de África; así como aquellas que siguieron los cazadores recolectores que a fines del pleistoceno viajaron más de dieciocho mil kilómetros desde Beringia hasta Tierra del Fuego. Las poblaciones que se desplazaron portaban un repertorio discreto de linajes la mayoría de ellos surgidos en Asia y los menos en las frías tierras de Beringia (O'Rourke y Raff 2010, Stoneking y Delfin, 2010). Muchos de ellos se perdieron probablemente durante los primeros milenios, mientras que otros llegaron a su casi desaparición tras la conquista, permaneciendo como relictos en regiones geográficas discretas asociados a poblaciones determinadas. En casos como estos los linajes mitocondriales pueden llegar a constituirse en marcadores de identidad, y por tanto podrían utilizarse para evaluar la relación entre las poblaciones actuales y sus antepasados.

### *ADN mitocondrial, generalidades.*

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una herramienta ideal para analizar la diferenciación de poblaciones e incluso caracterizar la individualidad humana (Budowle *et al.* 2003). Virtudes que derivan de su herencia uniparental materna, la ausencia aparente de recombinación, la elevada identidad de sus moléculas en un mismo individuo y la alta tasa de variación en su secuencia (5 a 10 veces mayor que el ADN nuclear) (Brown *et al.* 1979, Brown *et al.* 1982, Aquadro y Greenberg 1983). Adicionalmente el ADN mitocondrial presenta ventajas técnicas relevantes al momento de estudiarlo: el conocimiento de su secuencia completa, la que comprende 16.569 pares de bases (Anderson *et al.* 1981) y la gran cantidad de copias presentes por célula. Esta última característica es fundamental en lo que al análisis de muestras antiguas se refiere, ya que en la mayoría de los casos se cuenta con cantidades muy pequeñas de ADN altamente degradado.

La gran mayoría del ADNmt es codificante y sólo algo más de 1.000 pares de bases no codifican, éstas se concentran en la llamada región D-loop o control, constituida por dos regiones hipervariables principales ubicadas a ambos lados del origen de

replicación del ADNmt (HV1 y HV2). La región control ha sido usada ampliamente en los últimos años en estudios microevolutivos debido a su alto grado de polimorfismo, (Revisado en Pakendorf y Stoneking 2005).

### *ADN mitocondrial, poblaciones americanas nativas.*

Los estudios iniciales por amplificación y corte con enzimas de restricción (PCR-RFLP) en poblaciones aborígenes americanas las agruparon en cuatro haplogrupos principales, A, B, C y D, que se reconocen por: Haplogrupo A: ganancia de un sitio para la enzima Hae III en la posición 663; haplogrupo B: deleción 9 pb en la región intergénica COII/tRNALys; haplogrupo C: pérdida de un sitio para la enzima Hinc II en la posición 13259 y haplogrupo D: pérdida de un sitio para la enzima Alu I en las posiciones 5178 (Torroni *et al.* 1993). Se suma a ellos el haplogrupo X descrito en baja frecuencia en América del Norte (Brown *et al.* 1998). En base a la secuencia de las regiones HV1 y HV2 y de SNPs en región codificante se ha refinado la clasificación actual de los haplogrupos originarios en A2, B2, C1, D1 y X2a, los cuales tienen una distribución geográfica amplia a través de todo el continente, exceptuando el haplogrupo X2a, que está restringido sólo a indígenas de Norteamérica (Bandelt *et al.* 2003). Los haplogrupos A-D son frecuentes también en Asia, lo que apoya el origen noreste asiático de los linajes (Merriwether *et al.* 1995, Schurr y Wallace 2002). Estudios de los linajes amerindios han mostrado que además de los fundadores A2, B2, C1, D1 y X2a mencionados anteriormente, se encuentran también los haplogrupos D2a, D3, C4c y D4h3 dentro de los linajes fundadores, aumentando a 9 los reconocidos actualmente; existiendo además un gran número de subhaplotipos (Achilli *et al.* 2008).

En Chile las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales muestran un evidente gradiente latitudinal, donde la frecuencia del haplogrupo B2 disminuye desde valores cercanos al 70% en el extremo norte hasta llegar aparentemente a desaparecer hacia el tercio distal de Chiloé, situación que puede ser interpretada tanto como una no llegada de este haplogrupo hasta esas latitudes, como su desaparición por efecto de la deriva génica (Moraga *et al.* 2000, Rocco *et al.* 2002). Paralelo a la desaparición

de los haplogrupos A2 y B2, los haplogrupos C y D se hacen más frecuentes hasta fijarse (García *et al.* 2006). En virtud de estos datos la posibilidad de una primera migración portadora de sólo dos haplogrupos (C y D) planteada entre otros por Lalueza *et al.* 1997, parece tentadora, pero nuestros estudios en restos antiguos de Patagonia (Moraga *et al.* 2009) muestran individuos del haplogrupo B en el sitio Baño Nuevo 1, margen occidental de la estepa centropatagónica, 8.800 años AP (Mena *et al.* 2000, Mena *et al.* 2003), lo que sugiere que la ausencia de dicho haplogrupo probablemente se explique mejor por deriva genética.

#### *ADN mitocondrial, análisis en muestras antiguas.*

El estudio de ADN recuperado desde restos antiguos, particularmente de huesos humanos, se ha consolidado como una estrategia válida, conveniente y reproducible para estudiar la estructura genética de las poblaciones prehistóricas. Desde los primeros logros en la recuperación de ADN a partir de restos momificados (Pääbo *et al.* 1988, DeSalle y Grimaldi 1994, Höss *et al.* 1994), y desde restos óseos (Hagelberg *et al.* 1991a, Hagelberg *et al.* 1991b) se ha llegado en la actualidad a una etapa de madurez en que se han consolidado los protocolos básicos de extracción y amplificación, así como los diversos controles y validaciones que deben cumplir los resultados obtenidos, dado el riesgo de contaminación con ADNs recientes (revisado en O'Rourke *et al.* 2000, Pääbo *et al.* 2004).

En América por su parte se han realizado un número significativo de trabajos en los que se estudian restos humanos antiguos ya sea en contextos locales o desde el punto de vista poblacional (Stone y Stoneking 1993, 1998; Parr *et al.* 1996; Lalueza *et al.* 2001; Demarchi *et al.* 2001; Moraga *et al.* 2005; Gilbert *et al.* 2008). Para Patagonia y Tierra del Fuego estos se reducen a lo publicado por Lalueza y colaboradores para haplogrupos caracterizados por PCR-RFLP (Lalueza *et al.* 1993-94, Lalueza *et al.* 1995, Lalueza *et al.* 1997) y por García-Bour *et al.* 2004 para secuencias de la región HV1; todo esto sobre muestras Sélknam, Aónikenk, Yámana y Kawésqar del siglo XIX. Estos resultados muestran la presencia exclusiva de los haplogrupos C y D en estas poblaciones, así como la presencia del ancestral haplogrupo D4h3.

El presente trabajo busca evaluar la utilización de secuencias de ADNmt de haplotipos infrecuentes como un marcador de parentesco entre poblaciones indígenas actuales y sus posibles antepasados. En este entendido presentamos los resultados de la haplotipificación y secuenciación de la región control del ADN mitocondrial de 13 miembros de la comunidad Kawésqar de Punta Arenas y de cuatro enterratorios Kawésqar (isla Capitán Aracena, canal Maule, Englefield y cueva de la Cruz) y la comparación de todos ellos con las secuencias disponibles para el sur del subcontinente sudamericano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestras antiguas.*

Las muestras Arqueológicas corresponden a restos inhumados en 4 sitios de los canales australes y que han sido adscritos en base a sus características y situación geográfica a la cultura Kawésqar: dos muestras del sitio Cueva de La Cruz, Isla Madre de Dios, 50°19'958" S; 75°22'893" O (premolar y fragmento de costilla) (Legoupil 2001), una muestra del sitio Isla Englefield, en Bahía Colorada en la Isla Englefield, seno de Otway (fragmentos vértebras) (Legoupil 1987), una muestra sitio Canal Maule-1, 53°29' 57" S; 73°45' 28" O (fragmento costilla) (Constantinescu 2001, San Román y Morello 2001); pertenecientes todas a la colección del Instituto de la Patagonia de la Universidad de Magallanes. A este conjunto se suma dos muestras de tejido blando momificado (fragmento de músculo zona del tórax y de un antebrazo), como también un fragmento óseo de una falange de la extremidad superior derecha, del cuerpo encontrado en una gruta a orillas del mar en la isla Capitán Diego Aracena, ubicada a 62 millas náuticas al suroeste de la ciudad de Punta Arenas (Torres *et al.* 2009) (Fig.1). El acceso a este cuerpo parcialmente momificado fue gracias a la colaboración de la Policía de Investigaciones de Chile y la Armada de Chile. Las características de las muestras y las fechas asociadas se detallan en la tabla 1.

### *Muestras actuales.*

Las muestras de población viva corresponden a 13 miembros de la comunidad Kawésqar de Punta

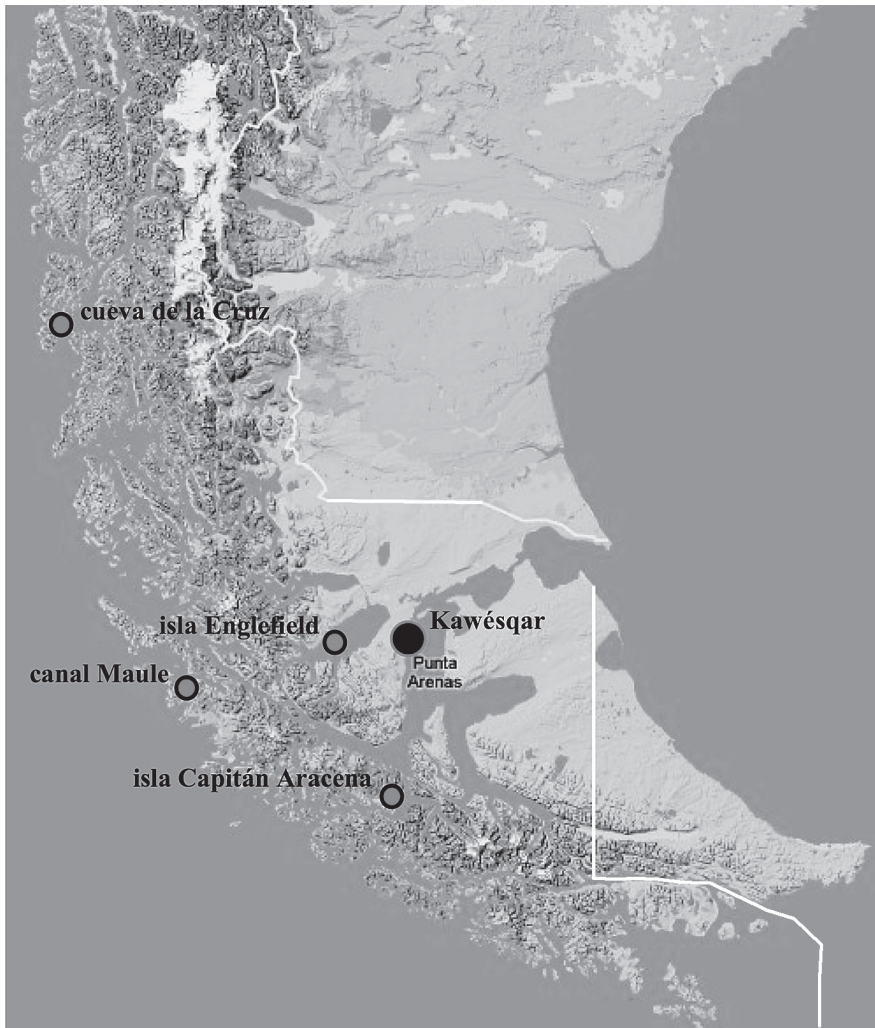


Fig. 1. Mapa del extremo sur de Sudamérica mostrando la posición geográfica aproximada de los sitios incluidos en este estudio.

Arenas, quienes accedieron a participar de manera libre e informada en el proyecto donando una muestra biológica, consistente en un hisopado bucal de cada uno de ellos. Las muestras fueron tomadas por personal del Laboratorio de Criminalística de la Policía de Investigaciones de Chile, con el debido consentimiento informado.

#### *Extracción de ADN de muestras antiguas.*

Las muestras fueron extraídas a partir de los fragmentos de hueso y raíces dentales. Los fragmentos de hueso o diente fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 4,8% por 20 minutos

para remover la contaminación superficial con ADN actual que pudiesen tener, debido a manipulaciones previas. El cloro fue removido y las muestras fueron lavadas repetidas veces con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril hasta la total remoción del hipoclorito (Kemp y Smith 2005). Las muestras fueron colocadas en tubos de 15 ml e incubadas en EDTA 0,5 M pH: 8,0 por 48 horas con agitación rotatoria permanente. Pasado este tiempo se agregó proteinasa K, continuando con la incubación por 16 a 24 horas más a 53°C. El ADN fue extraído utilizando Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) dos veces, seguido de una extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). (adaptada de Kemp *et al.* 2005, 2006). En

Tabla 1. Detalle de las muestras analizadas en este estudio.

	SITIO (muestra)	EDAD	SEXO	MUESTRA	FECHADO	REFERENCIA*
IP03	ENGLEFIELD (54891)	3 a 6 meses	I	Fragmentos vertebras	1700+/-120 AP.	Legoupil 1987.
IP04	CUEVA DE LA CRUZ (MD2-335)	Adulto		Fragmento costilla	250+/-30 AP	Legoupil 2001.
IP08	CUEVA DE LA CRUZ (D379)			Premolar (pieza dental suelta)		
IP10	CANAL MAULE-1 (58272)	>45 años	F	Fragmento costilla	920+/-55 AP	Constantinescu 2001. San Roman y Morello 2001.
MK02	ISLA CAPITAN ARACENA	Adulto	M	Fragmento músculo (antebrazo)	Sin fechado asociado, muy probablemente siglo XIX o XX	**Torres <i>et al.</i> 2009.
MK03	ISLA CAPITAN ARACENA			Falange distal		
MK04	ISLA CAPITAN ARACENA			Fragmento músculo (torax)		

\*Se consigna la referencia de la descripción de los sitios y/o restos óseos considerados en el estudio.

\*\*El cuerpo de Isla Capitán Aracena no ha sido objeto de un estudio antropológico acabado ya que por solicitud de la comunidad no fue removido de su lugar de entierro.

el caso de las muestras de músculo, debido a la imposibilidad de utilizar hipoclorito, se optó por la remoción mecánica de la capa superficial de los fragmentos seguida de irradiación con luz UV por 15 minutos por cada lado. Posteriormente se procedió de manera similar al protocolo para hueso prescindiendo de la incubación inicial en EDTA y prolongando el tiempo de incubación con proteinasa K. El ADN fue precipitado a temperatura ambiente por 16 horas desde la fase acuosa utilizando acetato de amonio e isopropanol. El ADN fue lavado con etanol, precipitado, secado y resuspendido en agua bidestilada estéril. De no ser absolutamente incolora la solución se procedió a purificar el extracto con sílica utilizando el kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega), según las indicaciones del proveedor (Kemp *et al.* 2006).

Todos los procedimientos que involucraron a las muestras antiguas fueron realizadas en un laboratorio exclusivamente destinado a este propósito, el cual se encuentra en un piso distinto del laboratorio principal y cuenta con un sistema de inyección de aire calidad HEPA. Todas las superficies fueron limpiadas con hipoclorito e irradiadas con luz UV. Todos los equipos son de uso exclusivo para la extracción de ADN antiguo y en los procedimientos se utilizó sólo material plástico desechable estéril. Los reactivos y muestras fueron siempre manipulados bajo campana de flujo laminar previamente irradiada con UV. En todas las extracciones se incluyó un

control blanco sin muestra. Las distintas muestras de un mismo individuo como es el caso de IP04 e IP08 para cueva de la Cruz, y MK02, MK03 y MK04 para isla Capitán Aracena fueron extraídas en ocasiones diferentes.

#### *Análisis de haplogrupos mediante PCR-RFLP.*

Las muestras fueron amplificadas para cuatro fragmentos de PCR de tamaños entre los 102 y 122 pb. El ADN fue amplificado mediante Hot Start PCR utilizando Go Taq Hot Start ADN polimerasa (Promega), utilizando el buffer 5x incluido con la enzima, dNTPs 200  $\mu$ M c/u, 25 pmoles de cada partidor y 100  $\mu$ g de BSA, con el fin de contrarrestar el efecto inhibidor sobre la taq-polimerasa de algunos contaminantes que copurifican con el ADN. El programa de PCR utilizado considera: denaturación inicial, 94°C por 5 min, 45 ciclos de: denaturación, 94°C por 45 seg; apareamiento, 45 seg. a una temperatura entre 50° y 58°C dependiendo de los partidores utilizados; elongación, 72° por 45 seg.; y elongación final a 72°C por 3 min. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de Agarosa al 3%. Los amplificados fueron analizados mediante la digestión por enzimas de restricción utilizando Hae III para el haplogrupo A, Hinc II para el haplogrupo C y Alu I para el haplogrupo D. Los productos de las digestiones se analizaron en geles de agarosa al 3%.

### *Análisis de las regiones HV1 y HV2 mediante secuenciación directa.*

Para el análisis de las regiones hipervariables 1 y 2 se utilizaron dependiendo del estado de deterioro del ADN diferentes combinaciones de oligonucleótidos que amplifican fragmentos en el rango de 202 a 212 pb, para HV1 y 176 a 206 pb para HV2. En el caso de no tenerse buenos resultados con este set se recurrió a 8 pares de óligos que amplifican fragmentos entre los 124 y 135 pb para HV1 y 126 a 134 pb para HV2. Estos amplificadores cubren un rango esperado entre las posiciones 16055 y 16382 para HV1 y entre las posiciones 57 y 330 para HV2. La amplificación de estos fragmentos se realizó mediante la técnica de PCR de manera similar a como se describe anteriormente para el análisis de haplogrupos, cambiando sólo las temperaturas de apareamiento (51° o 55° dependiendo de los partidores utilizados). Los amplificadores obtenidos fueron secuenciados en MacroGen Inc. en ambas direcciones utilizando los mismos partidores utilizados en la amplificación.

### *Extracción de ADN muestras actuales.*

Las muestras de mucosa bucal fueron extraídas mediante un protocolo modificado para hisopado bucal. Cada muestra fue recuperada desde el hisopo (cotonito) mediante incubación en agua bidestilada estéril (10 minutos), agitación enérgica (2 x 1 minuto) y centrifugación a 13.000 rpm por 2 min. El precipitado se resuspendió en buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH: 8,0; 50 mM EDTA pH: 8,0; 100 mM NaCl; 1% SDS; 0.2 mg/ml de proteinasa K) y se incubó 3 horas a 56°C con agitación suave. Se agregó NaCl 4,5 M, incubando en hielo por 5 minutos para precipitar las proteínas. El ADN fue precipitado con isopropanol a temperatura ambiente toda la noche, peleteado por centrifugación y lavado con etanol 75% y finalmente resuspendido en agua bidestilada estéril.

### *Análisis filogenético y estadístico.*

Las secuencias obtenidas para las regiones hipervariable I y II del D-loop (HV1 y HV2), para los amplificadores de restos óseos y población viva fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL-W

(Thompson *et al.* 1994). El análisis filogenético de los resultados se realizó mediante la utilización del programas MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.* 2004). Se realizaron redes de haplotipos (Network) para las muestras antiguas y las pertenecientes a individuos Kawésqar de haplogrupos C y D. Para la construcción de cada red se incluyeron además secuencias de la región HV1 (16081-16381bp) de poblaciones del norte y sur de Chile; Pehuenche, Mapuche y Yámana (Moraga *et al.* 2000), Fueguinos (García-Bour *et al.* 2004), Huilliche, Aymara, Atacameño y 3 poblaciones rurales de la isla de Chiloé (de Saint Pierre *et al.* 2008). Los análisis se realizaron con el software Network 4.5.10 (<http://www.fluxus-engineering.com/>) y se utilizaron las opciones Median Joining como algoritmo de cálculo y Máxima Parsimonia como opción de post-procesamiento (Bandelt *et al.* 1999, Polzin *et al.* 2003).

## RESULTADOS

Tanto los restos antiguos, como las muestras actuales de miembros de la comunidad Kawésqar de Punta Arenas fueron caracterizados para marcadores mitocondriales mediante haplotipificación por PCR-RFLP y secuenciación de las regiones hipervariables I y II (HV1 y HV2) tal como se describe en materiales y métodos.

Se obtuvo amplificadores para la totalidad de las muestras antiguas para los fragmentos de PCR-RFLP, pudiéndose por tanto caracterizarlas respecto de los cuatro haplogrupos fundadores A, B, C y D de manera no ambigua. Los resultados muestran que tanto IP03 (sitio isla Englefield) como las muestras MK02, MK03 y MK04 (cuerpo isla Capitán Aracena) pertenecen al haplogrupo C, mientras que las muestras de Canal Maule 1 (IP10) y de cueva de la Cruz (IP04, IP08) pertenecen al haplogrupo D. Respecto de los 13 individuos actuales pertenecientes a la etnia Kawésqar; uno es de haplogrupo A, 5 de haplogrupo C y los restantes 7 pertenecen al haplogrupo D.

Respecto a las secuencias, se obtuvo lecturas completas para las regiones HV1 y HV2 para 6 de las 7 muestras, siendo imposible obtener amplificadores secuenciados desde la muestra MK04 para todos los fragmentos, probablemente por la menor estabilidad del ADN en una muestra de tejido blando. Concordante con esto se requirió del set de partido-

Tabla 2. Polimorfismos en las regiones HV1 y HV2 del DNA mitocondrial en las muestras antiguas y población actual incluidas en este estudio.

rCRS	Haplogrupo	16051	16093	16111	16126	16183	16189	16223	16241	16274	16290	16298	16311	16318	16319	16325	16327	16342	16344	16362	16519	16527	73	103	146	150	152	153	185	195	207	212	235	249	258	263	290	291	309.1	309.2	315.1	489	493	
	A	T	C	T	A	T	C	A	G	C	T	T	A	G	T	C	T	C	T	T	T	A	G	T	C	T	A	G	T	G	T	A	A	C	A	A	A	-	-	-	T	A		
K01	D	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	C	.
K02	D	G	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	C	C	.
K03	D	G	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	C	C	.	
K04	D	G	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	C	C	.	
K05	C	.	C	.	C	C	C	T	.	.	.	C	.	.	.	C	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	d	.	G	d	d	C	.	C	C	G	
K06	A	.	.	T	.	.	T	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	C	T	.	G	.	.	.	C	G	.	G	.	.	C	C	C	.			
K07	D	G	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	C	C	.				
K08	D	G	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	C	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	C	C	C	.					
K09	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	C	T	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	d	.	G	d	d	.	C	C	G			
K10	C	G	.	.	.	.	T	.	A	.	C	C	.	.	.	C	T	.	.	.	C	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	d	.	G	d	d	C	.	C	C	.			
K11	D	G	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	C	C	.					
K12	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	C	T	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	d	.	G	d	d	.	C	C	G				
K13	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	G	A	.	T	.	.	.	.	.	.	d	T	G	d	d	.	C	C	G			
IP03	C	?	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	C	T	.	.	.	?	?	G	.	.	C	.	.	.	.	.	d	.	G	d	d	C	.	C	?	?			
IP04	D	?	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	C	?	?	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	C	?	?				
IP08	D	?	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	C	?	?	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	C	?	?				
IP10	D	?	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	?	?	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	C	C	?	?				
MK02	C	?	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	G	.	C	T	.	.	.	.	?	?	G	.	.	.	.	.	.	.	.	d	.	G	d	d	C	.	C	?	?			
MK03	C	?	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	G	.	C	T	.	.	.	.	?	?	G	.	.	.	.	.	.	.	.	d	.	G	d	d	C	.	C	?	?			

En la segunda columna se consignan los haplogrupos determinados por PCR-RFLP. En la fila superior los números corresponden a las posiciones nucleotídicas de las regiones HV1 y HV2 que presentaron variación en las muestras. La fila designada como rCRS (Revised Cambridge Reference Sequence) corresponde al nucleótido presente en esa posición en la secuencia de referencia NC\_012920. Las posiciones iguales a la referencia se señalan con un punto en la tabla, una d indica la delección de ese nucleótido y un signo ? indica que esa posición no fue secuenciada.

res para amplificadores de menor tamaño para lograr amplificadores de MK02, la otra muestra de músculo. Este mismo set de partidores fue necesario para amplificar desde IP03, en este caso el deterioro del ADN puede deberse a la mayor edad de la muestra (1.700 +/-120 AP) o por tratarse de los restos de un neonato. Para las muestras que pertenecían a un mismo individuo como es el caso de IP04 e IP08 de cueva de la Cruz se obtuvo idénticas secuencias, lo mismo ocurrió con las muestras MK02 y MK03 de isla Capitán Aracena. Esto es muy importante porque reafirma la autenticidad de los resultados de secuencia. Para las muestras recientes se obtuvo secuencias completas para HV1 y HV2. La totalidad de las secuencias se muestran en la tabla 2. Como puede verse los seis individuos pertenecientes al haplogrupo C presentan los cambios característicos

de éste: 16298C, 16325C y 16327T, en la HV1 y las delecciones 249d y 290-291dd en la HV2. Siendo tres de las muestras actuales (K09, K12 y K13) y una antigua (IP03, Englefield) idénticas al nodal del haplogrupo (fig. 2); mientras que K10 presenta una mutación recurrente en 16311 y la muy infrecuente transición 16274A. Finalmente K05 acumula sobre los cambios propios del nodal cinco cambios extremadamente infrecuentes (16093C, 16126C, 16183C, 16189C y 16344T) constituyendo un haplotipo no descrito previamente para poblaciones sudamericanas en la literatura. Una búsqueda en la base de datos de ADNmt de Sorenson muestra a una familia originaria de la región de los lagos con el mismo haplotipo. Las muestras del haplogrupo D por su parte pertenecen, con excepción de K01, poseedor de una variante 16311C del nodal, al infrecuente y aparentemente

ancestral haplogrupo D4h3 caracterizado por las posiciones 16241G y 16342C en HV1. Cuatro de las muestras de Kawésqar actuales (K02, K03, K04 y K07) comparten el mismo haplotipo que los restos

de Cueva de la Cruz (IP04, IP08), mientras que los otros dos (K11 y K08) comparten el haplotipo con la muestra de Canal Maule-1 (IP10) a sólo un paso mutacional de las demás.

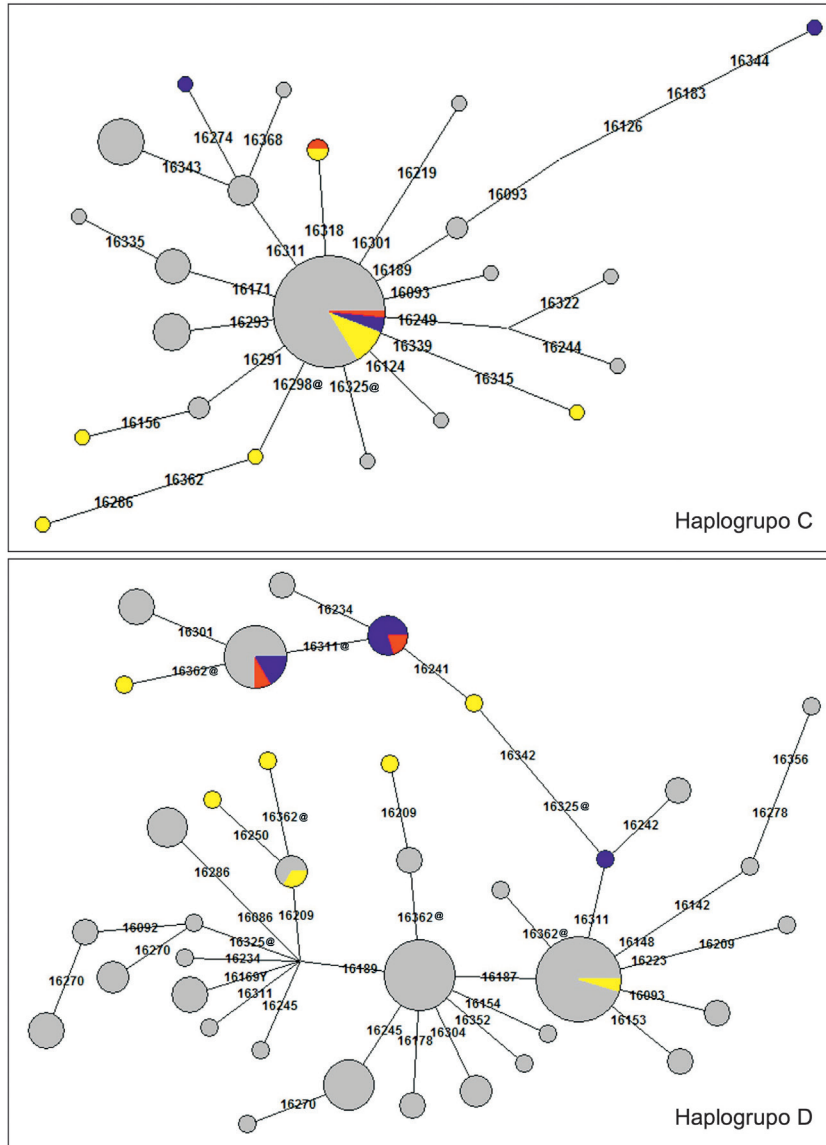


Fig. 2. Red de Haplotipos construida a partir de las secuencias de la región HV1 para diversas poblaciones nativas sudamericanas actuales (ver materiales y métodos para lista detallada) y antiguas. Se utilizó solo HV1 ya que los datos para HV2 no estaban disponibles para fueguinos en García-Bour *et al.* 2004. En gris, principales linajes encontrados en poblaciones nativas del sur de Sudamérica; en amarillo, resultados para fueguinos nativos del siglo XIX (García-Bour *et al.* 2004), en azul, individuos Kawésqar actuales (este estudio); en rojo, muestras antiguas consideradas en este estudio. Los números sobre las ramas corresponden a los pasos mutacionales (numerado según rCRS). El signo @ indica una reversión del cambio en esa rama.



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La presencia sólo de los haplogrupos C y D en las muestras de los cuatro sitios estudiados reafirma los hallazgos previos (Lalueza *et al.* 1997, Moraga *et al.* 2000, García-Bour *et al.* 2004) respecto a la ausencia de los haplogrupos A y B en proto-Kawésqar, proto-Yámana y Yámana, así como la aparente ausencia de estos haplogrupos al sur del estrecho de Magallanes desde fechas muy tempranas (Moraga *et al.* 2009). Respecto a las secuencias y tal como se aprecia en la figura 2, los individuos del haplogrupo C (muestras provenientes de isla Englefield e isla Capitán Aracena) presentan secuencias casi idénticas a las encontradas en Yámana (Moraga *et al.* 2000), en fueguinos antiguos (García-Bour *et al.* 2004) o en las propias muestras de Kawésqar secuenciadas en este estudio. Resulta interesante la identidad a nivel de HV1 de las muestras de isla Capitán Aracena con una muestra Aónikenk antiguo (García-Bour *et al.* 2004) con quien comparte una transición muy infrecuente (16318G) no descrita en otras poblaciones originarias de Chile y Sudamérica. En términos del análisis molecular, parece arriesgado proponer en base a sólo un par de muestras algún tipo de contacto entre poblaciones marítimas y terrestres, más aún con grupos continentales de Patagonia, siendo en principio más parsimonioso pensar que esta similitud radica en un ancestro común en las poblaciones de cazadores recolectores tempranos, que dieron origen a ámbos grupos. De todas formas la información histórica respecto de contactos entre poblaciones terrestres y marítimas apoya dicho contacto, al menos en periodos tardíos (Martinic 1999). Como se aprecia en la red de haplotipos (fig. 2), la mayoría de las secuencias se encuentran a unos pocos pasos mutacionales del nodal.

Ambos individuos del haplogrupo D, cueva de la Cruz y canal Maule 1, por su parte pertenecen al haplotipo D4h3 descrito inicialmente en población Cayapa del Ecuador (Rickards *et al.* 1999) y encontrado recientemente en un cuerpo de cerca de 10.000 años en Alaska (Kemp *et al.* 2007). Este haplotipo se encuentra en frecuencias extremadamente bajas a lo largo de la costa pacífica de América del Norte y del Sur, siendo sorprendentemente frecuente en fuego-patagonia. Por lo mismo son varios los autores que lo consideran uno de los haplotipos que

debieron estar presentes en los primeros cazadores recolectores que entraron a América y un trazador de una ruta costera temprana de los primeros migrantes (Kemp *et al.* 2007).

Los resultados obtenidos para los miembros de la comunidad Kawésqar actual son absolutamente consistentes tanto con la información previa, así como con los resultados de las muestras antiguas; con una alta frecuencia de los haplogrupos C y D, y en este último una sobrerepresentación del haplotipo D4h3. Este punto es extraordinariamente interesante ya que en la red de haplotipos para el haplogrupo D (fig. 2), Kawésqar actuales, Yámana actuales y las muestras de cueva de La Cruz y canal Maule 1 constituyen la mayoría de los individuos D4h3, más aún, son pocos los individuos pertenecientes a grupos canoeros dentro del haplotipo D1 y aún menos los que agrupan en el haplotipo derivado D1 + 16187T. Este último está ausente en Norteamérica, en gran parte de Sudamérica y altamente representado en las poblaciones del sur de Chile y Argentina (Moraga *et al.* 2000, Ginther *et al.* 1993) y según nuestros últimos estudios habría tenido su origen en Patagonia norte hace al menos 9.000 años (de Saint Pierre *et al.* 2009). Aún cuando no es posible aventurar, con el debido soporte genético-estadístico, en base a estos resultados una distribución desigual de haplotipos entre las poblaciones canoeras y terrestres, parece existir un vínculo entre D4h3 y las primeras. Este punto debe manejarse con cuidado ya que Bravi (com pers.) ha descrito una alta frecuencia de D4h3 en Tehuelche, claro que las muestras del lado argentino tienen un cambio en 16301 y no poseen el de 16311. No contamos, desde el punto de vista genético, con la información suficiente para aventurar un posible flujo génico, ni menos un origen común reciente para estos dos grupos poblacionales, pero resulta inquietante la concordancia con lo descrito para el cuerpo de isla Capitán Aracena (haplogrupo C) que como dijimos anteriormente comparte una transición muy infrecuente (16318G) con un Aónikenk antiguo. Por otra parte, desde el punto de vista de la evidencia arqueológica y más poderosamente del registro histórico, existen pruebas sólidas de contactos de Kawésqar tanto con poblaciones Aónikenk como Sélnam, las que en algunos casos podrían haber resultado incluso en eventos de mestizaje, como se sugiere para los restos de isla Karukinka (Aspillaga & Ocampo 1996, Martinic 1984, 1999).

Respecto a las muestras actuales lo que podría resultar controversial es el hallazgo de un individuo perteneciente al haplogrupo A2 entre los miembros de la comunidad, ya que este linaje es infrecuente a lo largo de todo Chile, alcanzando frecuencias por sobre el 5% solamente en el norte del país e inesperadamente en la localidad de Detif, en la isla de Chiloé (García *et al.* 2006). Es riesgoso aventurar una hipótesis, pero en virtud de la información histórica podría explicarse por la migración chilota con fines de explotación de recursos marinos en territorios Kawésqar (Martinić 1999).

Podemos concluir que los datos obtenidos para haplogrupos y secuencias mitocondriales de los miembros de la comunidad dejan en evidencia, una indudable cercanía entre los individuos Kawésqar incluidos en el estudio y las poblaciones aborígenes vivas y extintas de Patagonia y Tierra del Fuego previamente estudiadas. Basados en la alta frecuencia del haplotipo D4h3 podemos sugerir fuertemente que los individuos estudiados corresponden a descendientes de las poblaciones canoéras y que las poblaciones de Fuego-Patagonia constituyeron y constituyen relictos de las poblaciones de cazadores recolectores que llegaron a estas latitudes durante el holoceno temprano. Por lo mismo, y aún cuando la información que el DNA mitocondrial nos entrega, sólo nos habla de los linajes maternos, es posible visualizar que los resultados obtenidos tanto de poblaciones originarias vivas como de sus antepasados contribuye no sólo al conocimiento científico sino también a fortalecer las bases biológicas de la identidad Kawésqar.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos manifestar nuestro agradecimiento al profesor Mateo Martinić (Instituto de la Patagonia, Universidad de Magallanes) por permitir el acceso a las colecciones del Instituto. A Flavia Morello, Alfredo Prieto y todos los miembros del Instituto de la Patagonia que colaboraron en la obtención de las muestras, o con la información y referencias del material utilizado. Queremos además agradecer la participación en este estudio de miembros de la comunidad Kawésqar de Punta Arenas, así como al Consejo de Monumentos Nacionales y la Corporación Nacional de Desarrollo Indígena (CONADI) por su cooperación. Asimismo agradecemos a los

miembros de la Policía de Investigaciones de Chile de Punta Arenas y a la Armada de Chile que permitió el desplazamiento hasta la isla Capitán Aracena. El presente trabajo ha sido financiado por Proyecto FONDECYT 11060442, Convenio de Desempeño UTA Mecesup-2.

## BIBLIOGRAFÍA

- ACHILLI, A., U.A. PEREGO, C.M. BRAVI, M.D. COBLE, Q.P. KONG, S.R. WOODWARD, A. SALAS, A. TORRONI, H.J. BANDEL. 2008. The phylogeny of the four pan-American mtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One* 3(3):e1764.
- ANDERSON, S., A.T. BANKIER, B.G. BARRELL, M.H.L. DE BRUIJN, A.R. COULSON, J. DROUIN, I.C. EPERON, D.P. NIERLICH, B.A. ROE, F. SANGER, P.H. SCHREIER, A.J.H. SMITH, R. STADEN & I.G. YOUNG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- AQUADRO, C.F. & B.D. GREENBERG. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103:287-312.
- ASPILLAGA, E. & C. OCAMPO. 1996. Restos óseos de la isla Karukinka (Seno Almirantazgo). Informe preliminar. *Ans. Inst. Pat. Ser. Cs. Hs.* 24:153-161.
- BANDEL, H.J., C. HERRNSTADT, Y.G. YAO, Q.P. KONG, T. KIVISILD, C. RENGO, R. SCOZZARI, M. RICHARDS, R. VILLEMS, V. MACAULAY, N. HOWELL, A. TORRONI, Y.P. ZHANG. 2003. Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. *Ann Hum Genet* 67:512-524.
- BANDEL, H.J., P. FORSTER & A. RÖHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- BROWN, M.D., S.H. HOSSEINI, A. TORRONI, H.J. BANDEL, J.C. ALLEN, T.G. SCHURR, R. SCOZZARI, F. CRUCIANI, DC. WALLACE. 1998. mtDNA haplogroup X: an ancient link between Europe/Western Asia and North America? *Am J Hum Genet* 63:1852-1861.
- BROWN, W.M., M. GEORGE & A.C. WILSON. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76:1967-1971.
- BROWN, W.M., E.M. PRAGER, A. WANG & A.C. WILSON. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18:225-239.

- BUDOWLE, B., M.W. ALLARD, M.R. WILSON, & R. CHAKRA-BORTY. 2003. Forensics and mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4:119-41.
- CONSTANTINESCU, F. 2001. Canal Maule y Punta Santa Ana: El habitus cazador recolector marítimo femenino. (Patrones óseos característicos del modo de vida canoero en el extremo sur de Chile). *Anales Instituto de la Patagonia Ser. Cs. Hs.* 29:163-181.
- DEMARCHI, D.A., G.M. PANZETTA-DUTARI, S.E. COLANTONIO & A.J. MARCELLINO. 2001. Absence of the 9-bp deletion of mitochondrial DNA in Pre-Hispanic inhabitants of Argentina. *Human Biology*. 73: 575-582.
- DESALLE, R. & D. GRIMALDI. 1994. Very old DNA. *Current Biology*. 4:810-815.
- DE SAINT PIERRE, M., E. LLOP, M. MORAGA. 2008. Análisis microevolutivo de poblaciones indígenas del sur de Chile Comunicación personal, X Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica, La Plata, Argentina.
- DE SAINT PIERRE, M., E. LLOP, M. MORAGA. 2009. Microevolutionary analysis of populations of Amerindian origin from southern Chile. *Am J Phys Anthropol Suppl.* 48:116-116.
- GARCÍA-BOUR, J., A. PÉREZ-PÉREZ, S. ALVAREZ, S. FERNÁNDEZ, A.M. LÓPEZ-PARRA, E. ARROYO PARDO, D. TURBÓN. 2004. Early population differentiation in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia: ancient mtDNA sequences and Y-Chromosome STR characterization. *Am J Phys Anthropol* 123:361-370.
- GARCÍA, F., M. MORAGA, S. VERA, H. HENRÍQUEZ, E. LLOP, E. ASPILLAGA Y F. ROTHHAMMER. 2006. mtDNA Microevolution in Southern Chile's Archipelagos. *Am J Phys Anthropol* 129:473-481.
- GINTHER, C., D. CORACH, G.A. PENACINO, J.A. REY, F.R. CARNESE, M.H. HUTZ, A. ANDERSON, J. JUST, F.M. SALZANO, M.C. KING. 1993. Genetic variation among the Mapuche Indians from the Patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes. *EXS* 67:211-219.
- GILBERT, M.T., D.L. JENKINS, A. GÖTHERSTROM, N. NAVERAN, J.J. SANCHEZ, M. HOFREITER, P.F. THOMSEN, J. BINLADEN, T.F. HIGHAM, R.M. YOHE, R. PARR, L.S. CUMMINGS, E. WILLERSLEV. 2008. DNA from pre-Clovis human coprolites in Oregon, North America. *Science*. 9:320 (5877):786-789.
- HAGELBERG, E. & J.B. CLEGG. 1991. Isolation and characterization of DNA from archeological bone. *Proc R Soc Lond B*. 244:45-50.
- HAGELBERG E, L. BELL, T. ALLEN, A. BOYDE, J. JONES & J.B. CLEGG. 1991. Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Proc R Soc Lond B*. 244:399-407.
- HÖSS, M., M. KRINGS & S. PÄÄBO. 1994. Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia*. 50, 524-529.
- KEMP, B.M., D.G. SMITH. 2005. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Science International* 154:53-61.
- KEMP, B.M., C. MONROE, D.G. SMITH. 2006. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *Journal of Archaeological Science* 33:1680-1689.
- KEMP B.M, R.S. MALHI, J. MCDONOUGH, D.A. BOLNICK, J.A. ESHLEMA, O. RICKARDS, C. MARTINEZ-LABARGA, J.R. JOHNSON, J.G. LORENZ, E.J. DIXON, T.E. FIFIELD, T.H. HEATON, R. WORL, D.G. SMITH. 2007. Genetic analysis of early holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas. *Am J Phys Anthropol* 132(4):605-21.
- KUMAR, S., K. TAMURA & M. NEI. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings* in 5:150-163.
- LALUEZA, C., A. PEREZ-PEREZ, E. PRATS, P. MORENO, J. PONS, D. TURBON. 1993-94. Ausencia de la delección de 9 bp COII/tRNA<sup>Lys</sup> en aborígenes de fuego-patagonia mediante analisis de DNA antiguo. *Ans. Inst. Pat. Ser. Cs. Sc.* 22:181-191.
- LALUEZA, C., A. PEREZ-PEREZ, E. PRATS, D. TURBON. 1995. Linajes mitocondriales de los aborígenes de tierra del fuego y patagonia. *Ans. Inst. Pat. Ser. Cs. Sc.* 23:75-86.
- LALUEZA, C., A. PEREZ-PEREZ, E. PRATS, L. CORNUDELLA, D. TURBON. 1997. Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum Mol Genet* 6:41-46.
- LALUEZA-FOX, C., F.L. CALDERÓN, F. CALAFELL, B. MORERA & J. BERTRANPETIT. 2001. MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean. *Ann Hum Genet*. 65:137-151.
- LEGOUPIL, D. 1987. Un recién nacido de 17 siglos descubierto en la Isla Englefield (Seno de Otway, Magallanes). *Ans. Inst. Pat. Ser. Cs. Sc.* 17:109-111.
- LEGOUPIL, D. 2001. Un premier bilan archéologique. In *Ultima Patagonia 2000*, Association Centre Terre, FFS : 25-27.
- MARTINIC M. 1984. Los Guaicurúes ¿Un grupo racial definido o un accidente étnico? *Ans. Inst. Pat. Ser. Cs. Hs.* 15:63-69.

- MARTINIC M. 1999. Dawsonians o Selkkaar: otro caso de mestizaje aborigen histórico en Magallanes. *Ans. Inst. Pat. Ser. Cs. Hs.* 27:79-88.
- MARTINIC M. 1999. La migración chilota en Magallanes. Apreciación histórica sobre sus causas, características y consecuencias. *Ans. Inst. Pat. Ser. Cs. Hs.* 27:27-47.
- MENA, F., V. LUCERO, O. REYES, V. TREJO & H. VELÁSQUEZ. 2000. Cazadores tempranos y tardíos en la cueva Baño Nuevo-1, margen occidental de la estepa centropatagónica XI Región de Aisén, Chile. *Ans. Inst. Pat. Ser. Cs. Sc.* 28:173-195.
- MENA, F., O. REYES, JR. STAFFORD, SOUTHON, J., 2003. Early Human remains from Baño Nuevo-1 Cave, Central Patagonian Andes, Chile. *Quaternary International* 109:113-121.
- MERRIWETHER DA., F. ROTHHAMMER, RE. FERRELL. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am J Phys Anthropol.* 98(4):411-30.
- MORAGA, M., P. ROCCO, J.F. MIQUEL, F. NERVI, E. LLOP, R. CHAKRABORTY, F. ROTHHAMMER, & P. CARVALLO. 2000. Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the southern cone of the continent. *Am J Phys Anthropol* 113:19-29.
- MORAGA, M., C. SANTORO, V. STANDEN, P. CARVALLO & F. ROTHHAMMER. 2005. Microevolution in Prehistoric Andean Populations: Chronologic mtDNA variation in the Desert Valleys of Northern Chile. *Amer J. Phys. Anthropol.* 127:170-181.
- MORAGA, M., E. ASPILLAGA, F. MENA. 2009. Search for founder mitochondrial lineages in Holocene human remains in Patagonia. *Am J Phys Anthropol Suppl.* 48:193-193.
- O'ROURKE, D.H., M.G. HAYES, & S.W. CARLYLE. 2000. Ancient DNA studies in physical anthropology. *Annu. Rev. Anthropol.* 29:217-242.
- O'ROURKE, D.H. & J.A. RAFF. 2010. The Human Genetic History of the Americas: The Final Frontier *Current Biology* 20:R202-R207.
- PÄÄBO, S., J. GIFFORD & A.C. WILSON. 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acid Research.* 16:9775-9787.
- PÄÄBO, S., H. POINAR, D. SERRE, V. JAENICKE-DESPRES, J. HEBLER, N. ROHLAND, M. KUCH, J. KRAUSE, L. VIGILANT, M. HOFREITER. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet.* 38:645-79.
- PAKENDORF, B., & M. STONEKING. 2005. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 6:165-83.
- PARR, R., S. CARLYLE & D. O'ROURKE. 1996. Ancient DNA analysis of fremont amerindians of the salt lake wetlands. *Amer J. Phys. Anthropol.* 99:507-518.
- POLZIN, T., & S.V. DANESCHMAND. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31:12-20
- RICKARDS, O., C. MARTINEZ-LABARGA, J.K. LUM, G.F. DE STEFANO, R.L. CANN. 1999. mtDNA history of the Cayapa Amerinds of Ecuador: detection of additional founding lineages for the native American populations. *Am J Hum Genet* 65:519-530.
- ROCCO, P., C. MORALES, M. MORAGA, J.F. MIQUEL, F. NERVI, E. LLOP, P. CARVALLO, F. ROTHHAMMER. 2002. Composición Genética de la Población Chilena. Distribución de Polimorfismos de DNA Mitocondrial en Grupos Originarios y en la Población Mixta de Santiago. *Rev. Méd. Chile* 130:125-131.
- SAN ROMAN, M. y F. MORELLO. 2001. Canal Maule: Nuevos antecedentes sobre practicas funerarias en el Archipiélago fueguino. *Ans. Inst. Pat. Ser. Cs. Hs.* 29:149-161
- SCHURR, T.G. & D.C. WALLACE. 2002. Mitochondrial DNA diversity in Southeast Asian populations. *Hum Biol.* 74(3):431-52. The Sorenson Molecular Genealogy Foundation Database: A Repository of Correlated Genealogical and Genetic Data. www.SMGF.org (2007).
- STONE, A. & M. STONEKING. 1993. Ancient DNA a pre-columbian amerindian population. *Amer. J. Phys. Anthropol.* 92: 463-471.
- STONE, A.C. & M. STONEKING. 1998. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *Am J Hum Genet.* 62:1153-1170.
- STONEKING M. & F. DELFIN. 2010. The Human Genetic History of East Asia: Weaving a Complex Tapestry. *Current Biology* 20:R188-R193.
- THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS & T.J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- TORRES, F., M. MORAGA, J. RÍOS. 2009. Characterization of Genetic Markers of a Kawésqar Body and the Last Descendants of the Same Ethnic Group. *Profiles in DNA.* Promega. 12(1):3-5.
- TORRONI, A., T.G. SCHURR, M.F. CABELL, M.D. BOWN, J.V. NEEL, M. LARSEN, D.G. SMITH, C.M. VULLO & D.C. WALLACE. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet.* 53:563-590.