

ANALISIS DE HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES EN RESTOS HUMANOS DE SITIOS ARQUEOLOGICOS DE LA PROVINCIA DE CORDOBA

Rodrigo Nores y Darío A. Demarchi*

Laboratorio de Bioantropología. Museo de Antropología. Facultad de Filosofía y Humanidades. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina

PALABRAS CLAVE Sierras Centrales; ADN antiguo; evolución local; Nsitu

RESUMEN Se presentan los primeros resultados tendientes a caracterizar genéticamente la población antigua que ocupaba el actual territorio de la Provincia de Córdoba a través del estudio de haplogrupos del ADN mitocondrial en muestras arqueológicas procedentes de distintos contextos culturales, geográficos y temporales. De las 44 muestras de hueso y diente analizadas, 35 pudieron ser tipificadas de manera inequívoca. La distribución de haplogrupos observada en la muestra arqueológica difiere significativamente de la observada entre los habitantes contemporáneos que viven en la misma región y poseen linajes maternos nativos, tanto si la variación es evaluada a través del Test Exacto como del programa Nsitu, que tiene en cuenta la acción de factores evolutivos tales como deriva, flujo génico, número de generaciones y fluctuaciones en los tamaños poblacionales.

Puede advertirse a lo largo del tiempo un incremento gradual en la proporción de los linajes C y D y una disminución concomitante de A y B, tendencia que ya se evidencia en una submuestra de antigüedad intermedia (con un promedio de antigüedad de 562 años AP). Es decir, la tendencia mencionada no refleja solamente los profundos reordenamientos poblacionales que llegaron con la Conquista y sus secuelas, sino que ya aparece en tiempos prehispánicos tardíos. La distribución geográfica de haplogrupos muestra algunas diferencias evidentes, si bien no llegan a ser significativas debido al pequeño tamaño muestral. Las submuestras Sierras y Llanura, con una antigüedad promedio similar, difieren particularmente en la incidencia del haplogrupo B, que es muy frecuente en la primera y está casi ausente en la segunda. *Rev Arg Antrop Biol* 13(1):43-54, 2011.

KEY WORDS Central Sierras; ancient DNA; local evolution; Nsitu

ABSTRACT We present the first results of the genetic characterization of the ancient population that occupied the current territory of the Province of Córdoba (Argentina) through the study of mitochondrial DNA haplogroups from archaeological samples belonging to different cultural, geographic and temporal contexts. Of the 44 bone and tooth samples analyzed, 35 could be characterized unambiguously. The distribution of haplogroups observed in the archaeological sample differs significantly from that observed among the contemporary inhabitants living in the same region and presenting native maternal lineages. This is true whether the variation is evaluated through with the Exact Test or with the Nsitu program, that takes into account a number of evolutionary variables (drift, gene flow, number of generations and population

size fluctuations). It is possible to observe in the course of time a gradual increase in the proportion of haplogroups C and D and a concomitant decrease of A and B, a trend already present in a subsample of intermediate age (with an average age of 562 years BP). That is, the above pattern reflects not only the profound population rearrangements resulting from the Conquest and its aftermath, but appears already in late pre-Hispanic times. Geographic variation in the distribution of haplogroups shows some clear differences, though they are not statistically significant due to the small sample size. The subsamples Sierras and Llanura (plains), with a similar average age, differ particularly in the incidence of haplogroup B, being very common in the first and almost absent in the second. *Rev Arg Antrop Biol* 13(1):43-54, 2011.

El ADN mitocondrial (ADNm_t) y el cromosoma Y presentan polimorfismos que permiten determinar linajes parentales específicos maternos y paternos, respectivamente. A través del análisis de los genomas del ADN_{m_t} y del cromosoma Y es posible determinar los linajes genéticos presentes en el seno de las poblaciones e inferir la manera en que éstos se dispersaron a lo largo de determinadas áreas

Financiamiento: Subsidios de FONCyT (PICT 2007 1549); CONICET (PIP 2010 N° 1); MINCyT Córdoba (PID 2008).

*Correspondencia a: Darío A. Demarchi. Museo de Antropología. Facultad de Filosofía y Humanidades. Universidad Nacional de Córdoba. Av. Hipólito Yrigoyen 174. 5000 Córdoba. Argentina. E-mail: demarchi@ffyh.unc.edu.ar

Recibido 15 Diciembre 2010; aceptado 07 Abril 2011

geográficas (Schurr y Sherry, 2004; Serre y Hudson, 2006). Los nativos americanos pueden ser agrupados en cinco haplogrupos mitocondriales diferentes, designados como A, B, C, D y X, los cuales han sido identificados a partir de marcadores diagnósticos por RFLP (Restriction fragment length polymorphisms) o secuenciamiento de la región hipervariable I (RHV-I) (Torrioni et al., 1993). Los haplogrupos A, B, C y D se encuentran distribuidos con distintas frecuencias en todo el continente americano, mientras que el quinto (X) es menos frecuente y ha sido encontrado solamente en América del Norte (Dornelles et al., 2005).

Una de las principales restricciones para el estudio de la variabilidad genética y el origen de los nativos americanos ha sido, hasta hace algunos años, la necesidad de trabajar con poblaciones vivientes. Algunos autores sostienen que la gran reducción en la población aborígena a partir de la Conquista y sus secuelas (guerras, esclavitud, hambre y epidemias) ha diezmando el número de linajes originales, modificando en gran medida el pool génico de los amerindios. Además, el aporte masivo de genes europeos y africanos durante cinco siglos ha oscurecido aún más los patrones de diversidad genética anteriores a la Conquista (Crawford, 1998). La posibilidad de recuperar y estudiar moléculas de ADN de restos humanos antiguos, gracias a técnicas moleculares cada vez más eficientes, permite sortear las limitaciones antes mencionadas (Kaestle y Horsburgh, 2002).

Existe en la actualidad un número creciente de investigaciones sobre las características genéticas de las poblaciones antiguas americanas, lo cual proporciona un contexto temporal para el estudio del poblamiento de América (Stone y Stoneking, 1993, 1998; Merriwether et al., 1994; Monsalve et al., 1996; O'Rourke et al., 1996, 2000; Ribeiro dos Santos et al., 1996; Kolman y Tuross, 2000; Kaestle y Horsburgh, 2002; Moraga et al., 2005; Shinoda et al., 2006; Kemp et al., 2007). Por otra parte, los estudios sobre ADN antiguo de poblaciones prehispánicas de Argentina son escasos, habiéndose publicado hasta el momento sólo

tres trabajos (Demarchi et al., 2001; Wilson et al., 2007; Carnese et al., 2010). Permanecen inéditos, aunque han sido presentados preliminarmente en reuniones científicas, algunos estudios realizados en poblaciones de la región pampeana (Figueiro y Sans, 2007; Figueiro et al., 2010), Patagonia (Dejean et al., 2008) y el NOA (Dejean et al., 2004, 2005; Dejean y Carnese, 2007).

En el estado actual del conocimiento sobre las poblaciones prehispánicas del área central del territorio argentino, arqueológicamente conocida como "Sierras Centrales" (González, 1952), existen dos grandes temas aún por resolver y que son significativos en el contexto de la evolución de las poblaciones americanas. Uno es el poblamiento inicial y el proceso de colonización y expansión en este espacio y otro se refiere a la posterior evolución local de esas poblaciones. La evidencia arqueológica muestra que los grupos humanos que habitaron en tiempos prehispánicos la región central de Argentina desarrollaron a lo largo del tiempo diversas estrategias y adaptaciones al ambiente que resultaron exitosas a largo plazo (Laguens, 1999; Pastor, 2006; Rivero, 2007; Laguens y Bonnin, 2009).

La adopción de la agricultura y la alfarería a inicios de la era cristiana y los desarrollos regionales que se produjeron a partir de estos cambios le confirieron a estas poblaciones características de unicidad que las diferencian de los desarrollos culturales producidos en otras regiones del país (Laguens y Bonnin, 2009). Tal vez estas características propias llevaron a los conquistadores a denominar de una manera homogeneizante a los habitantes de la región como "Comechingones", denominación que posteriormente alcanzaría categoría clasificatoria con un contenido simultáneamente etnográfico, racial y cultural (Laguens y Bonnin, 2009). Sin embargo, dichas estrategias y desarrollos locales, constituyeron adaptaciones particulares a distintos ambientes y formas de vida con modalidades propias, junto con otras compartidas, que permiten inferir, en momentos próximos a la Conquista, la existencia de una diversidad de grupos étnicos que contra-

dice la supuesta unicidad cultural de la región, postulada por los primeros cronistas (Laguens, 1999; Dantas y Figueroa, 2004; Pastor, 2006; Laguens y Bonnin, 2009). Las diversas estrategias implementadas por estos grupos, sumadas a las transformaciones que se produjeron a lo largo del tiempo en los espacios colonizados de las Sierras Centrales conducen a una serie de interrogantes: ¿Se produjeron a lo largo del tiempo distintas migraciones a esta región? Si éstas existieron, ¿qué consecuencias implicaron para las poblaciones ya asentadas? ¿Las poblaciones agricultoras que encontraron los españoles a su llegada reemplazaron a los grupos de cazadores recolectores que se asentaron en la región hace más de 10000 años o existió en cambio, continuidad biológica a partir del poblamiento inicial y un desarrollo cultural propio? ¿Existió variabilidad biológica entre las subregiones? ¿Cuándo y cómo surgió?

Basados en evidencias arqueológicas, morfológicas y moleculares derivadas de investigaciones previas y de nuestros propios trabajos preliminares, nuestro grupo ha planteado dos hipótesis principales sobre el poblamiento y la posterior evolución local de las poblaciones (Fabra et al., 2005, 2007; Laguens et al., 2007). La primera propone que, pese a la diversidad cultural existente entre las distintas subregiones arqueológicas en que puede dividirse a la provincia (Traslasierra y Noroeste, Sierras Chicas, Sur-Sierra de Comechingones, Noreste y llanuras extraserranas, ver Laguens y Bonnin 2009:283) no existió en la población antigua una variación biológica significativa (Fabra et al., 2005). Esta homogeneidad reflejaría su origen común reciente y/o un sostenido flujo genético debido a la ausencia de barreras geográficas y culturales infranqueables. En segundo lugar, al tomar en consecuencia, a estos grupos como una única población, se evidencia una asociación mucho más estrecha de los antiguos habitantes de Córdoba con los grupos de Patagonia y Tierra del Fuego que con las poblaciones andinas (Fabra et al., 2005, 2007; García y Demarchi, 2006, 2009). Esta similitud biológica estaría en concordancia con las expectativas derivadas de eviden-

cias arqueológicas y sería coherente con la idea de que fueron parte de la misma oleada de poblamiento, en el límite Pleistoceno-Holoceno (Laguens et al., 2007).

En este artículo se presentan los primeros resultados tendientes a caracterizar genéticamente la población antigua de la Provincia de Córdoba a través del estudio de haplogrupos del ADN mitocondrial en muestras arqueológicas procedentes de distintos contextos culturales, geográficos y temporales. Se puso a prueba, a partir de la distribución de haplogrupos del ADNmt en la población antigua y contemporánea y por medio de procedimientos estadísticos desarrollados para ese fin específico, si hubo reemplazo poblacional o continuidad biológica a lo largo del tiempo.

MATERIAL Y METODOS

Procedencia y antigüedad de las muestras

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras óseas o dentales de restos humanos de origen arqueológico del acervo del Museo de Antropología (FFyH, UNC) y de distintos museos públicos y privados de la Provincia de Córdoba. Los criterios iniciales de selección de muestras que se establecieron al elaborar el diseño del estudio fueron: a) ser representativas de alguna de las subregiones arqueológicas en que puede ser dividida la Provincia de Córdoba; b) presentar buen estado general de preservación y c) poseer contexto arqueológico preciso o bien datación radiocarbónica por AMS (Accelerator Mass Spectrometry). Debido a que el marco temporal o contexto arqueológico de muchas de las muestras no estaba debidamente registrado, se procedió a la datación radiocarbónica por AMS de la totalidad de las muestras. Estos análisis fueron llevados a cabo en la Universidad de California en Irvine y en la Universidad de Tokio. Detalles sobre las dataciones individuales, junto a valores isotópicos para carbono, estroncio y nitrógeno serán presentados en otra publicación. El rango de antigüedad de las muestras datadas va desde los 3360±20 AP hasta los

345±20 AP (estimaciones no calibradas). En la Figura 1 se muestra la procedencia geográfica aproximada de cada una de las muestras incluidas en el análisis.

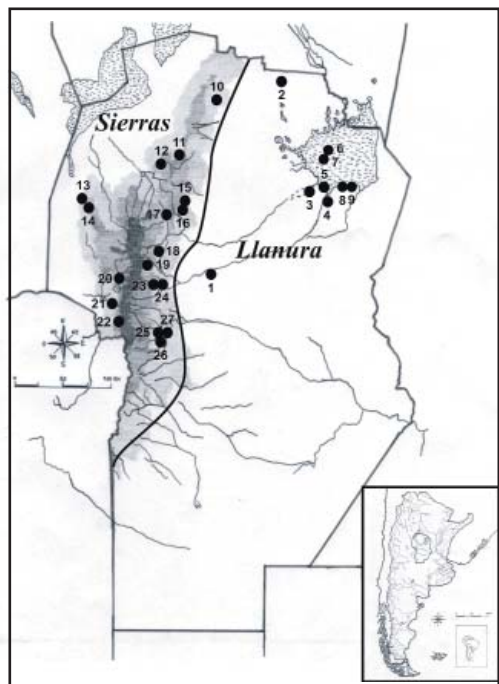


Fig. 1. Mapa de la Provincia de Córdoba donde se indican los sitios arqueológicos de procedencia de los individuos incluidos en este trabajo, agrupados por submuestras geográficas. Llanura: 1) Rincón, 2) Laguna de la Sal, 3) La Para, 4) Marull, 5) El Diquecito (5 individuos), 6) Isla Tigre, 7) El Mistolar, 8) Colonia Müller, 9) Orihuela. Sierras: 10) Cerro Colorado, 11) Ischilín, 12) Nunsacat, 13) Charquina, 14) Rosca Yaco, 15) La Granja, 16) Agua de Oro (3 individuos), 17) Ayampitín, 18) Cuesta Blanca, 19) Copina, 20) Cañada Larga, 21) Guasmará, 22) Loma Bola, 23) Los Molinos (3 individuos), 24) Potrero de Garay, 25) Banda Meridional del Lago, 26) Quillinzo y 27) Central Nuclear.

A pesar de que el tamaño muestral es relativamente pequeño (N=35), en los análisis estadísticos se definieron dos submuestras temporales para investigar si era posible observar alguna tendencia temporal en la variación genética o por el contrario, la distribución de haplogrupos permanecía estable a lo largo del tiempo. La submuestra Antigua (N=15)

comprende los especímenes dentro de un rango de antigüedad de 3360-920 AP, mientras que la submuestra Intermedia (N=8) incluye a los datados en el rango 818-345 AP. La línea de corte entre ambas es arbitraria y se estableció para dejar un tamaño muestral similar en las dos submuestras, buscando mayor poder estadístico en las comparaciones. Cabe mencionar que dos individuos no fueron incluidos en estas submuestras ya que aún están siendo datados.

Dado que también era nuestro objetivo poner a prueba la hipótesis de homogeneidad genética a través del espacio geográfico, es decir si existieron diferencias regionales en la distribución de haplogrupos, se separó la muestra total en dos submuestras geográficas. La primera, mayoritaria (N=22) incluye a los individuos de sitios de la región serrana (Sierras) y la segunda (N=13) comprende a los que provienen de la llanura extraserrana (Llanura), integrada por 12 individuos procedentes de la región circundante a la laguna Mar Chiquita y uno de Río Segundo (Llanura pampeana).

Para comparar la distribución de frecuencias de la muestra estudiada frente a la que presenta la población contemporánea (Actual) que habita la región, se utilizó la información publicada por García y Demarchi (2006, 2009), en donde se determinaron las frecuencias de haplogrupos mitocondriales de habitantes con linajes maternos nativos de las localidades de San Francisco del Chañar, Villa de Soto, San Carlos Minas, San Marcos Sierras, Villa Dolores, Chancaní, La Para y La Tordilla. En esos estudios se constató la gran homogeneidad genética de la población, no observándose estructura geográfica, por lo que para el presente análisis se utilizaron las frecuencias de haplogrupos de la población total.

Análisis de laboratorio

Precauciones generales para evitar la contaminación

Durante el trabajo de laboratorio fueron adoptadas diversas precauciones para minimizar el riesgo de contaminación, siguiendo las

directivas presentadas por Pääbo et al. (2004):

(1) Las áreas de pre y post-PCR utilizadas fueron laboratorios independientes y aislados, situados en extremos opuestos del edificio y en diferentes pisos.

(2) Antes de cada extracción o amplificación por PCR, las superficies de trabajo, material de laboratorio y pipetas fueron irradiados durante toda la noche con luz ultravioleta (UV) y lavados con lavandina al 10%, ambos agentes que desnaturalizan el ADN.

(3) Se utilizaron pipetas y reactivos dedicados exclusivamente al análisis de ADN antiguo (ADNa) y material descartable estéril.

(4) Durante el trabajo de laboratorio, se usó continuamente guardapolvo, barbijo y guantes descartables, estos dos últimos fueron cambiados frecuentemente.

(5) Las reacciones de PCR fueron ensambladas en campana de flujo laminar horizontal bajo flujo de aire positivo a través de filtro HEPA en un ambiente estéril equipado con luz UV.

(6) En cada reacción de PCR se incluyó un control negativo y un blanco de extracción para identificar respectivamente, falsos positivos de amplificación y contaminación con ADN exógeno durante el proceso de extracción del ADNa.

(7) La extracción y amplificación del ADNa fue realizada por un único investigador (Rodrigo Nores), que no posee linaje amerindio.

Extracción de ADN

Con algunas modificaciones, se siguió el protocolo de extracción de ADNa descrito por Lee et al. (2006). En primer término, las muestras óseas o dentarias fueron sumergidas en lavandina al 6% durante 5-15 minutos, luego lavadas repetidamente con agua destilada y secadas en estufa. Posteriormente, las muestras fueron irradiadas con luz UV por 30 minutos de cada lado para eliminar el ADN superficial que aun pudiera existir. Finalmente, las muestras fueron pulverizadas con torno dental a baja velocidad o mortero y el polvillo obtenido (0,3-0,5g) decalcificado en un microtubo de 2ml en presencia de 1ml de una solución de 0,5M EDTA (pH 8,0) y 1mg de proteinasa K

a 56°C durante 24 a 48 horas, con agitación frecuente. El ADN fue posteriormente extraído del sobrenadante obtenido después de una centrifugación a 5000g por 5 minutos, usando el kit Wizard SV PCR Clean-Up System (Promega).

Análisis de linajes/haplogrupos maternos

Las poblaciones sudamericanas pueden agruparse en cuatro linajes/haplogrupos mitocondriales primarios (A, B, C y D), distribuidos con diferentes prevalencias a lo largo del continente. Estos haplogrupos están determinados por cuatro polimorfismos, tres de ellos (A, C y D) caracterizados a partir de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), que determinan la presencia o ausencia de sitios de restricción y uno (B) definido por una delección de 9 pares de bases (pb) (Schurr et al., 1990). En el presente trabajo, las regiones mitocondriales polimórficas que determinan los haplogrupos A, C y D fueron amplificadas y tipificadas por APLPs (Amplified product-length polymorphisms), método basado en la inclusión de una secuencia no complementaria en el extremo 5' de uno de los dos iniciadores específicos de alelo utilizados en la reacción de PCR. El uso de tales iniciadores permite la amplificación de productos de diferente tamaño, distinguiendo cada uno de los 2 alelos. El método de APLPs ya fue utilizado en análisis de ADNa, habiéndose obtenido resultados muy satisfactorios (Adachi et al., 2004, 2009; Shinoda et al., 2006). Por otro lado, la determinación del haplogrupo B fue realizada mediante PCR directa, ya que la sola presencia de la delección origina un fragmento de amplificación de menor tamaño. En ambos casos, el diagnóstico de polimorfismos se realiza directamente por electroforesis en geles nativos de acrilamida:bisacrilamida. La determinación de los 4 haplogrupos fue realizada mediante dos reacciones de PCR, una de las cuales contenía los iniciadores para determinar los haplogrupos A y D y la otra, para B y C. El programa de PCR incluía un ciclo inicial de desnaturalización del ADN de 6 minutos a 94°C, 40 ciclos de desnaturalización por 30 segundos, hibridación a 53°C por 45 segun-

dos y elongación a 72°C por 30 segundos y un paso de elongación final de 5 minutos. El producto de ambas PCR fue sembrado junto con un marcador de tamaño molecular en gels nativos de acrilamida:bisacrilamida (19:1) al 8%, teñidos posteriormente por 30 minutos con GelStar 1:10000 (Lonza) y visualizados en transiluminador de luz UV. Se utilizaron los iniciadores descritos en Umetsu et al. (2005) para tipificar los haplogrupos A, C y D y los publicados por Wrischnik et al. (1987) para el haplogrupo B.

Análisis estadístico

La diversidad genética (H) para cada muestra poblacional se calculó utilizando el método de Tajima (1989), donde $H = (n/n-1)(1-\sum x^2)$, siendo n el tamaño poblacional y x la frecuencia de cada haplogrupo encontrado.

La variación entre muestras poblacionales, definidas a partir de variables temporales o geográficas, se llevó a cabo utilizando el Test Exacto de diferenciación muestral basado en las frecuencias de haplogrupos (Raymond y Rousset, 1995).

¿Continuidad o reemplazo?

Para distinguir de manera eficiente entre un escenario de reemplazo y uno de continuidad local, se utilizó el programa Nsitu (Cabana et al., 2008). Este software permite incorporar diferentes factores microevolutivos (flujo génico, deriva, fluctuación en los tamaños poblacionales, número de generaciones) que pueden afectar la variación genética humana, poniendo a prueba la hipótesis nula de que las diferencias en las frecuencias de haplogrupos entre la población arqueológica y la contemporánea, se han producido solamente a partir de procesos microevolutivos *in situ*. Para correr este programa deben establecerse varios parámetros:

Tamaño de la población: Se basa en una estimación del tamaño efectivo de la población femenina (N_{ef}) (Wright, 1931), siendo $N_{ef} = (N_c/2) \times 0,30$, donde N_c (tamaño censal) se divide por 2 (el modelo incluye sólo a las mujeres) y toma sólo el 30% del número resultan-

te. Este último valor es una estimación de la proporción de la población femenina total, que probablemente contribuirá reproductivamente a las generaciones subsiguientes (Cavalli-Sforza y Bodmer, 1971). En nuestro análisis se consideraron dos N_{ef} diferentes en un escenario de fluctuación de la población a lo largo del tiempo entre un mínimo y un máximo. El más conservador considera un N_{ef} de 500, variando de 100 a 1000 y el otro, un N_{ef} de 1000, variando de 200 a 2000. Este último número 2000, es el máximo permitido por el programa, por lo cual se debió trabajar con valores bastante conservadores en cuanto a tamaño poblacional total (correspondería a un número censal de 13333 individuos), pero no demasiado alejado de lo esperado, considerando el área de distribución de los sitios de donde se obtuvieron las muestras analizadas.

Flujo génico

De acuerdo al modelo, se definieron de manera arbitraria 6 regiones circundantes (Cabana et al., 2008), que podrían corresponderse a las regiones geográficas NOA, región chaqueña, Cuyo, noreste de Patagonia, Litoral y región pampeana, con cuyas poblaciones los habitantes prehispánicos de Córdoba pudieron haber intercambiado genes. Se consideraron dos escenarios posibles, uno con un flujo génico de un individuo, por región y por generación y otro de 5 individuos. Estas estimaciones son bastante conservadoras pero sirven para poner a prueba la hipótesis nula de continuidad local. También se consideró un tercer escenario improbable, donde la variación genética a través del tiempo sería debida a la deriva génica en ausencia total de flujo génico.

Número de generaciones

Se estimó el número de generaciones transcurridas entre la población inicial y la final en cada análisis dividiendo el número de años que separan ambas muestras por 27, que fue el tiempo generacional considerado (Fix, 1977; Fenner, 2005).

Detalles del modelo y aplicaciones a poblaciones reales se pueden encontrar en Cabana (2002), Cabana et al. (2008) y Smith et al. (2009).

RESULTADOS

Durante el desarrollo de la investigación no se observaron productos de amplificación en ninguno de los controles negativos (de PCR o blanco de extracción). De las 44 muestras analizadas, 35 han podido tipificarse de manera inequívoca, estando los 4 haplogrupos fundadores representados en la muestra. De estas 35 muestras positivas, 18 corresponden a extracciones de ADN_a realizadas a partir de restos dentarios, mientras que 17 provienen de restos óseos. La distribución de haplogrupos mitocondriales en la muestra total se presenta en la Tabla 1. La distribución de haplogrupos tomando la muestra arqueológica total, difiere significativamente de la observada entre los habitantes contemporáneos que viven en la misma región y poseen linajes maternos nativos (Test Exacto, $p=0,038\pm 0,003$). Esto se debe a que, a pesar de que el haplogrupo C es el más frecuente en ambas muestras, en la arqueológica el B está fuertemente representado y el D es el que manifiesta el menor valor porcentual, comportamiento que se invierte en la muestra *Actual*.

La comparación entre la muestra *Actual* y la submuestra Antigua da diferencias aun más significativas ($p=0,015\pm 0,001$), dado que en ésta es aun mayor la incidencia de los linajes A y B y menor la del linaje D. En cambio, no

existen diferencias significativas entre la muestra Actual y la Intermedia ($p=0,438\pm 0,005$) ni entre las dos submuestras arqueológicas (Antigua vs. Intermedia, $p=0,583\pm 0,004$).

La distribución de haplogrupos en las submuestras geográficas Sierras y Llanura muestra algunas diferencias evidentes, aunque no llegan a ser estadísticamente significativas ($p=0,310\pm 0,005$), dado el pequeño tamaño muestral. La más notoria es que el haplogrupo B es el más frecuente en la submuestra Sierras mientras que en Llanura es el de menor incidencia. Los haplogrupos A y D tienen una representación bastante alta en Llanura pero son menos frecuentes en Sierras, mientras que el haplogrupo C posee una alta incidencia en ambas submuestras.

La diversidad de haplogrupos presentes en la muestra arqueológica total y en cada una de las submuestras (temporal y geográfica) en que fue separada dada la estimación de H , es aún mayor que la observada en la población contemporánea (que ya de por sí es alta) y en otras poblaciones de alta diversidad intragrupal como las del Chaco argentino ($H=0,688$).

A pesar de incorporar valores alternativos para distintos parámetros poblacionales (tamaño efectivo, número de generaciones, flujo génico, deriva), los análisis de variación genética temporal realizados a partir del programa Nsitu coinciden plenamente con los obtenidos

TABLA 1. Distribución de haplogrupos mitocondriales nativos americanos (valores porcentuales entre paréntesis) en la muestra total

| Muestra | Rango de Antigüedad | Promedio Antigüedad | N | Hg A | Hg B | Hg C | Hg D | H |
|---------------------------|---------------------|---------------------|-----|---------|---------|---------|---------|-------|
| Arqueológica ¹ | 3360-345 AP | 963 AP | 35 | 8 (23) | 9 (26) | 12 (34) | 6 (17) | 0,756 |
| Actual ² | | ----- | 214 | 36 (17) | 21 (10) | 97 (45) | 60 (28) | 0,681 |
| Submuestras | | | | | | | | |
| Antigua | 3360-920 AP | 1443 AP | 15 | 4 (27) | 5 (33) | 5 (33) | 1 (7) | 0,752 |
| Intermedia | 818-345 AP | 562 AP | 18 | 3 (17) | 4 (22) | 7 (39) | 4 (22) | 0,765 |
| Sierras | 3360-345 AP | 978 AP | 22 | 4 (18) | 8 (36) | 7 (32) | 3 (14) | 0,749 |
| Llanura | 1872-370 AP | 937 AP | 13 | 4 (31) | 1 (8) | 5 (38) | 3 (23) | 0,756 |

¹Dos de las muestras incluidas en el análisis no han sido aun datadas, por lo que el N de la muestra total no coincide con la suma de las dos submuestras temporales.

²García y Demarchi (2009).

a partir del Test Exacto (Tabla 2). Existen diferencias en la distribución de haplogrupos mitocondriales entre la muestra arqueológica total y la *Actual* (salvo en los casos en que se consideró ausencia de migración o migración de sólo un individuo por región y por generación, partiendo de una población inicial de $N_{ef}=500$) que rechazan la hipótesis nula de continuidad poblacional a lo largo del tiempo. Las comparaciones entre la submuestra Antigua y la *Actual* son altamente significativas en todos los escenarios evolutivos posibles. En cambio, al igual que lo observado con el Test Exacto, no hay diferencias significativas en la distribución de la variación genética entre muestras temporales contiguas, es decir entre la Antigua y la Intermedia o entre esta última y la *Actual*.

DISCUSION

Extracción y análisis de ADN antiguo

Las precauciones tomadas para evitar la contaminación con ADN contemporáneo en los diferentes pasos de análisis (obtención de las muestras, extracción del ADN y amplificación por PCR), constituyen un factor determinante para encarar estudios de ADN antiguo e inciden preponderantemente en el éxito o el fracaso de este tipo de investigaciones.

Merece destacarse el alto porcentaje de eficiencia obtenido en la extracción de ADN y en su tipificación (79,5%) similar al encontrado por Smith et al. (2009). Se identificaron 3 factores que han contribuido de manera

TABLA 2. Condiciones de simulación y resultados del análisis con *N*situ (N_{ef} = tamaño efectivo de la población femenina)

| Muestra Inicial | Muestra Final | Número de Generaciones | N_{ef} | Flujo Génico | p | ¿Continuidad? | | | | |
|--------------------|---------------|------------------------|----------|--------------|--------|---------------|-----|---|-------|----|
| Arqueológica Total | Actual | 36 | 500 | 0 | 0,182 | SI | | | | |
| | | | | 1 | 0,093 | SI | | | | |
| | | | | 5 | 0,011 | NO | | | | |
| | | | 1000 | 0 | 0,026 | NO | | | | |
| | | | | 1 | 0,013 | NO | | | | |
| | | | | 5 | 0,000 | NO | | | | |
| | | | | Antigua | Actual | 53 | 500 | 0 | 0,040 | NO |
| | | | | | | | | 1 | 0,009 | NO |
| | | | | | | | | 5 | 0,000 | NO |
| 1000 | 0 | 0,001 | NO | | | | | | | |
| | 1 | 0,000 | NO | | | | | | | |
| | 5 | 0,000 | NO | | | | | | | |
| | Antigua | Intermedia | 33 | 500 | 0 | 0,479 | SI | | | |
| | | | | | 1 | 0,449 | SI | | | |
| | | | | | 5 | 0,348 | SI | | | |
| 1000 | | | | 0 | 0,390 | SI | | | | |
| | | | | 1 | 0,372 | SI | | | | |
| | | | | 5 | 0,312 | SI | | | | |
| | | | | Intermedia | Actual | 21 | 500 | 0 | 0,456 | SI |
| | | | | | | | | 1 | 0,378 | SI |
| | | | | | | | | 5 | 0,223 | SI |
| 1000 | 0 | 0,408 | SI | | | | | | | |
| | 1 | 0,210 | SI | | | | | | | |
| | 5 | 0,128 | SI | | | | | | | |

substantial a la obtención de este resultado satisfactorio. En primer lugar, haber seleccionado muestras óseas y dentarias que se encontraban en muy buen estado de conservación. En nuestra experiencia, existe una alta asociación entre la calidad de la muestra y la posibilidad de extraer ADN de la misma. En segundo lugar, la eficiencia del método de extracción, derivado del desarrollado por Boom et al. (1990), que se basa en la gran afinidad que poseen las partículas de sílice por el ADN en presencia de una solución salina en alta concentración (en este caso, tiocianato de guanidina 5M). En este estudio se utilizó el kit Wizard SV PCR Clean-Up System (Promega), de características similares al kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen), frecuentemente usado en estudios de esta naturaleza (por ejemplo, Yang et al., 1998; Lee et al., 2006), el cual ha sido diseñado originalmente para aislar productos de PCR de entre 100pb y 10000pb (10kb). Este método resulta ideal para la extracción de ADN en restos humanos de procedencia arqueológica, donde el ADN está sumamente degradado y los fragmentos a ser amplificados por lo general son muy pequeños (a veces menores a 250pb). Por otro lado, permite eliminar parte de la posible contaminación, ya que la columna retiene a las moléculas de ADN mayores a 10kb, las que seguramente corresponden a contaminación post mortem con ADN humano moderno o ADN de hongos o bacterias, en vez de auténtico ADN (Yang et al., 1998). En tercer lugar, la eficiencia del método de APLPs, con cebadores que amplifican fragmentos muy pequeños (entre 52 y 107pb) y que permiten tipificar inequívocamente las muestras, evitándose la ambigüedad respecto a la presencia o no de un sitio mutado, la cual es uno de los problemas del método RFLP causado por una incompleta digestión enzimática. Además de los factores señalados, es necesario destacar la alta sensibilidad de la tinción con GelStar, que además de ser menos mutagénico que el bromuro de etidio permite detectar bandas del orden de los 20pg.

Análisis de la variación genética

Los resultados obtenidos tanto a partir del Test Exacto como del programa Nsitu coinciden en señalar que la distribución de haplogrupos mitocondriales en la muestra de la población antigua difiere significativamente de la que presentan los habitantes contemporáneos de la región que poseen linajes americanos. Puede advertirse a lo largo del tiempo un incremento gradual en la proporción de los linajes C y D y una disminución concomitante de A y B, tendencia que ya se evidencia en la submuestra de antigüedad intermedia (con un promedio de antigüedad de 562 años AP). Es decir, la tendencia mencionada no refleja solamente los profundos reordenamientos poblacionales que llegaron con la Conquista y sus secuelas (exterminio, migraciones regionales, encomiendas) sino que aparece antes, durante la evolución local de la población en tiempos prehispanicos tardíos.

La variación genética observada entre las submuestras Sierras y Llanura, con una antigüedad promedio similar, no llega a ser significativa. En principio entonces, la hipótesis de homogeneidad genética en las distintas subregiones arqueológicas, sostenida a partir del análisis de variables craneanas en poblaciones arqueológicas (Fabra et al., 2005) y moleculares en poblaciones contemporáneas (García y Demarchi, 2006, 2009), no puede ser contrastada por nuestros resultados. Si bien existen diferencias evidentes entre ambas submuestras, llamando la atención principalmente que en la submuestra Sierras el linaje B sea el más común mientras que en la Llanura es el menos frecuente, el pequeño tamaño muestral no permite que las diferencias observadas lleguen a ser estadísticamente significativas.

La alta diversidad observada en la muestra a través del estimador H se ajusta a lo esperable para una población con una localización geográfica central, cruce de caminos, sin barreras naturales infranqueables, que permite el flujo génico con poblaciones de regiones vecinas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta estimación no fue realizada sobre

una verdadera población biológica (entendida como un conjunto de individuos interfértiles que comparten un espacio geográfico y temporal común) sino sobre una muestra heterogénea tanto geográfica como temporalmente, hecho que nos lleva a tomar con precaución este resultado.

Por otra parte, la hipótesis de un origen común de los antiguos habitantes de las Sierras Centrales y los grupos humanos de Patagonia y Tierra del Fuego (Fabra et al., 2005, 2007; García y Demarchi, 2006, 2009) no encuentra sustento en nuestros resultados. A diferencia de lo encontrado en los habitantes contemporáneos de Córdoba, donde los haplogrupos C y D son mayoritarios (García y Demarchi, 2006, 2009), tal como sucede entre los aborígenes del extremo sur sudamericano, quienes poseen casi exclusivamente esos haplogrupos, la muestra arqueológica aquí investigada se aleja de ese perfil genético. Si bien el haplogrupo C está bien representado, es además muy alta la incidencia en las muestras de la región serrana del haplogrupo B (frecuente entre los aborígenes andinos y chaqueños), mientras que en la llanura extraserrana, mayoritariamente representada por individuos que vivieron en la región de la laguna Mar Chiquita, es el haplogrupo A (común entre los Guaraníes del Noreste) el que también aparece con relativamente alta frecuencia. Una posible explicación parcial para el incremento gradual de C y D en la muestra contemporánea, es el ingreso de mapuches y pehuenches a territorio argentino a partir del siglo XVII, empujados por la persecución española y atraídos también por cuestiones económicas (la caza y la existencia del ganado salvaje) y que se extendió hasta el siglo XIX, en el proceso de araucanización del norte de la Patagonia y la región pampeana (Martínez Sarasola, 1992).

Para concluir podemos decir que, a través de estos resultados preliminares se percibe un panorama evolutivo bastante complejo, con una variación biológica temporal que pone en evidencia una alta dinámica poblacional, lo cual supone la existencia a lo largo del tiempo de diversos eventos evolutivos, tales como

fluctuaciones poblacionales, flujo génico y deriva. La evolución temporal de la población ha sido considerada sólo recientemente para las sociedades prehispánicas de las Sierras Centrales, ya que hasta hace relativamente poco se imponía una visión culturalista, donde el factor temporal constituía una variable de poco interés, lo cual llevó a la construcción de cuadros descriptivos estáticos y homogeneizantes (Laguens y Bonnin, 2009). En consecuencia, para poder continuar con el estudio de las poblaciones prehispánicas del centro de Argentina es indispensable por un lado, ampliar el tamaño muestral y con ello el rango temporal y geográfico y por el otro extender el análisis genético a las secuencias de la región control del ADN mitocondrial, lo cual permitirá refinar el nivel de análisis al proporcionar un grado de definición mayor de linajes y sublinajes.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro profundo agradecimiento a los museos de la Provincia de Córdoba que permitieron el acceso a las colecciones humanas bajo su cuidado: Museo de Antropología (FFyH, UNC), Museo Histórico Municipal La Para, Museo Municipal Capitán Juan de Zevallos (Valle Hermoso), Museo Aníbal Montes (Miramar), Museo Aníbal Montes (Río Segundo) y Museo Comechingón (Mina Clavero). Nuestra gratitud también a Mariana Fabra por su ayuda en la caracterización geográfica y temporal de las muestras y por la lectura crítica del manuscrito. R. Nores es becario posdoctoral y D. Demarchi es miembro de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

LITERATURA CITADA

- Adachi N, Shinoda K, Umetsu K, Matsumura H. 2009. Mitochondrial DNA analysis of Jomon skeletons from the Funadomari site, Hokkaido, and its implication for the origins of Native American. *Am J Phys Anthropol* 138:255-265.
- Adachi N, Umetsu K, Takigawa W, Sakaue K. 2004. Phylogenetic analysis of the human ancient mito-

ANÁLISIS DE ADNmt HUMANO ANTIGUO DE CORDOBA

- chondrial DNA. *J Archaeol Sci* 31:1339-1348.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503.
- Cabana GS. 2002. A demographic simulation model to assess prehistoric migrations. Ph. D. Thesis. Ann Arbor: University of Michigan.
- Cabana GS, Hunley K, Kaestle FA. 2008. Population continuity or replacement? A novel computer simulation approach and its application to the Numic expansion (Western Great Basin, USA). *Am J Phys Anthropol* 135:438-447.
- Carnese FR, Mendisco F, Keyser C, Dejean CB, Dugoujon JM, Bravi CM, Ludes B, Crubézy E. 2010. Paleogenetical study of pre-columbian samples from Pampa Grande (Salta, Argentina). *Am J Phys Anthropol* 141(3):452-462.
- Cavalli-Sforza LL, Bodmer WF. 1971. The genetics of human populations. San Francisco: W. H. Freeman.
- Crawford MH. 1998. The origins of Native Americans. Evidence from anthropological genetics. New York: Cambridge University Press.
- Dantas M, Figueroa G. 2004. Análisis tecnológico y funcional del registro cerámico del valle de Salsacate y pampas de altura adyacentes. Tesis de Licenciatura. Manuscrito disponible en la Biblioteca de la Facultad de Filosofía y Humanidades. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.
- Dejean CB, Carnese FR. 2007. Diversidad genética de muestras precolombinas de la República Argentina. *Rev Arg Antrop Biol* 9(1):77.
- Dejean CB, Keyser CB, Avena SA, Dugoujon JM, Ludes B, Crubezy E, Carnese FR. 2008. Análisis genético de muestras esqueléticas provenientes del Canal de Beagle. X Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica. La Plata. Argentina. Edición en CD-ROM.
- Dejean C, Keyser-Tracqui C, Crubézy E, Blandin P, Goicoechea AS, Avena SA, Carnese FR. 2004. Paleogenética en muestras esqueléticas precolombinas de Pampa Grande, Prov. de Salta, Argentina. VIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica. Caracas. Venezuela. Edición en CD-ROM.
- Dejean CB, Keyser-Tracqui C, Crubézy E, Blandin P, Dugoujon JM, Ludes B, Avena S, Goicoechea AS, Carnese FR. 2005. ADN antiguo en restos esqueléticos precolombinos de Pampa Grande, Prov. de Salta, Argentina. *Rev Arg Antrop Biol* 7(1):58.
- Demarchi DA, Panzetta-Dutari GM, Colantonio SE, Marcellino AJ. 2001. Absence of the 9-bp deletion of mitochondrial DNA in pre-hispanic inhabitants of Argentina. *Hum Biol* 73:575-582.
- Dornelles CL, Bonatto SL, De Freitas LB, Salzano FM. 2005. Is haplogroup X present in extant South American Indians? *Am J Phys Anthropol* 127:439-448.
- Fabra M, Laguens A, Demarchi DA. 2005. Análisis intra e inter poblacional de rasgos craneanos no métricos en aborígenes prehispánicos del actual territorio de Córdoba. *Rev Arg Antrop Biol* 7(2):45-67.
- Fabra M, Laguens A, Demarchi DA. 2007. Human colonization of the central territory of Argentina: design matrix models and craniometric evidence. *Am J Phys Anthropol* 133(4):1060-1066.
- Fenner JN. 2005. Cross-cultural estimation of the human generation interval for use in genetics-based population divergence studies. *Am J Phys Anthropol* 128:415-423.
- Figueiro G, Sans M. 2007. Primeros resultados del análisis de ADN mitocondrial del sitio Arroyo Seco 2, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev Arg Antrop Biol* 9(1):78.
- Figueiro G, Hidalgo P, Sans M. 2010. Antigüedad, variabilidad y dispersión del linaje C1d en América. V Simposio Internacional "El Hombre Temprano en América: a cien años del debate Ameghino-Hrdlička (1910-2010)". La Plata. Argentina.
- Fix AG. 1977. The demography of the Semai Senoi. Anthropological papers No. 62. Ann Arbor: University of Michigan, Museum of Anthropology.
- García A, Demarchi DA. 2006. Incidencia de linajes parentales amerindios en poblaciones del norte de Córdoba. *Rev Arg Antrop Biol* 8(1):57-72.
- García A, Demarchi DA. 2009. Distribution of native american mtDNA haplogroups in Central Argentina. *Hum Biol* 81(1):59-69.
- González AR. 1952. Antiguo horizonte precerámico en las Sierras Centrales de la Argentina. *Runa* V:110-133.
- Kaestle FA, Horsburgh KA. 2002. Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics. *Ybk Phys Anthropol* 42:92-130.
- Kemp BM, Malhi RS, McDonough J, Bolnick DA, Eshleman JA, Rickards O, Martinez-Labarga C, Johnson JR, Lorenz JG, Dixon EJ, Fifield TE, Heaton TH, Worl R, Smith DG. 2007. Genetic analysis of early holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas. *Am J Phys Anthropol* 132:605-621.
- Kolman CJ, Tross N. 2000. Ancient DNA analysis of human populations. *Am J Phys Anthropol* 111:5-23.
- Laguens A. 1999. Arqueología del contacto hispano indígena. Un estudio de cambios y continuidades en las sierras centrales de argentina. Oxford: British Archaeological Reports International Series.
- Laguens AG, Bonnin M. 2009. Sociedades indígenas de las Sierras Centrales. Arqueología de Córdoba y San Luis. Córdoba: Editorial Universidad Nacional de Córdoba.
- Laguens A, Demarchi DA, Fabra M. 2007. Un estudio bioantropológico y arqueológico de la colonización humana del sector sur de las Sierras Pampeanas. En: Olmedo E, Ribero F, compiladores. Debates actuales en Arqueología y Etnohistoria. Río Cuarto: Editorial Universidad Nacional de Río IV. p 119-134.
- Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Chung U, Kim CY, Shin KJ. 2006. East Asian mtDNA haplogroup determination in Koreans: Haplogroup-level coding region SNP analysis and subhaplogroup-level control region se-

- quence analysis. *Electrophoresis* 27:4408-4418.
- Martínez Sarasola C. 1992. Nuestros paisanos los indios. Buenos Aires: EMECÉ.
- Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell RE. 1994. Genetic variation in the New World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia* 50:592-601.
- Monsalve MV, Cardenas F, Guhl F, Delaney AD, Devine DV. 1996. Phylogenetic analysis of mtDNA in South American mummies. *Ann Hum Genet* 60:293-303.
- Moraga M, Santoro CM, Standen VG, Carvallo P, Rothhammer F. 2005. Microevolution in prehistoric Andean populations: Chronologic mtDNA variation in the desert valleys of northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 127:170-181.
- O'Rourke DH, Carlyle SW, Parr RL. 1996 Ancient DNA: Methods, progress, and perspectives. *Am J Hum Biol* 8:557-571.
- O'Rourke DH, Hayes MG, Carlyle SW. 2000. Spatial and temporal stability of mtDNA haplogroup frequencies in Native North America. *Hum Biol* 72:15-34.
- Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38:645-679.
- Pastor S. 2006. Arqueología del Valle de Salsacate y pampas de altura adyacentes (Sierras Centrales de Argentina). Una aproximación a los procesos sociales del período prehispánico tardío (900-1573 DC). Tesis Doctoral. Manuscrito disponible en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina.
- Raymond M, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
- Ribeiro dos Santos AK, Santos SE, Machado AL, Guapindaia V, Zago MA. 1996. Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in pre-columbian natives of the Amazon region. *Am J Phys Anthropol* 101:29-37.
- Rivero D. 2007. Ecología de cazadores-recolectores en las Sierras de Córdoba. Investigaciones en el sector meridional del Valle de Punilla y pampas de altura. Tesis Doctoral. Manuscrito disponible en la Biblioteca de la Facultad de Filosofía y Humanidades. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.
- Schurr TG, Sherry ST. 2004. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *Am J Hum Biol* 16:420-439.
- Schurr TG, Ballinger SW, Gan YY, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weiss KM, Wallace DC. 1990. Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am J Hum Genet* 46:613-623.
- Serre D, Hudson TJ. 2006. Resources for genetic variation studies. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7:443-457.
- Shinoda K, Adachi N, Guillen S, Shimada I. 2006. Mitochondrial DNA analysis of ancient Peruvian highlanders. *Am J Phys Anthropol* 131:98-107.
- Smith SE, Hayes MG, Cabana GS, Huff C, Coltrain JB, O'Rourke DH. 2009. Inferring population continuity versus replacement with aDNA: A cautionary tale from the Aleutian Islands. *Hum Biol* 81:407-426.
- Stone AC, Stoneking M. 1993. Ancient DNA from a pre-columbian Amerindian population. *Am J Phys Anthropol* 92:463-471.
- Stone AC, Stoneking M. 1998. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: Implications for the peopling of the new world. *Am J Hum Genet* 62:1153-1170.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding native american mitochondrial DNAs. *Am J Hum Genet* 53:563-590.
- Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I, Adachi N, Miyoshi A, Kashimura S, Park KS, Wei YH, Watanabe G, Osawa M. 2005. Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations. *Electrophoresis* 26:91-98.
- Wilson AS, Taylor T, Ceruti MC, Chavez JA, Reinhard J, Grimes V, Meier-Augenstein W, Cartmell L, Stern B, Richards MP, Worobey M, Barnes I, Gilbert MT. 2007. Stable isotope and DNA evidence for ritual sequences in Inca child sacrifice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(42):16456-16461.
- Wright S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.
- Wrischnik LA, Higuchi RG, Stoneking M, Erlich HA, Arnheim N, Wilson AC. 1987. Length mutations in human mitochondrial DNA: Direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Nucleic Acids Res* 15:529-542.
- Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dudar J, Saunders SR. 1998. Technical Note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthropol* 105:539-543.