

UCH-FC
MAG-B
F. 954
C. 1



Cazadores recolectores canoeros australes: aproximación a la historia poblacional de grupos tardíos de Patagonia y Tierra del Fuego a partir de DNA antiguo y marcadores de herencia uniparental.

Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De
Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por
Constanza Pilar de la Fuente Castro

Agosto, 2014

Director de Tesis Dr. Mauricio Moraga Vergara

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata.

Constanza Pilar de la Fuente Castro

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 6 de Agosto.

Director de Tesis:

Dr. Mauricio Moraga V.



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. David Véliz B.

Dr. Marco A. Méndez

Lloró por un largo tiempo, muy largo. Hasta que ella misma se convirtió en pájaro, el marutuwérelakipa, que voló de la isla hacia el mar abierto.

Leyenda relatada por Carrupakó le kipa, Julia, a Martín Gusinde, a principios de la década de 1920.

BIOGRAFÍA



Realicé mis estudios de pregrado en el departamento de Antropología de la Facultad de Ciencias Sociales de la Universidad de Chile. Desde temprano, mi interés ha sido el área de Genética y Evolución Humana, de modo que finalicé mis estudios en la mención de Antropología Física dictada por el departamento de Antropología. Durante mi tesis de pregrado (2009-2010), realizada bajo la tutela del Dr. Mauricio Moraga y en el laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución Humana (Programa de Genética, ICBM, Facultad de

Medicina, Universidad de Chile), comencé a trabajar con DNA antiguo como una aproximación a la diversidad bacteriana de la cavidad oral a partir de cálculo dental antiguo, obtenido en contextos arqueológicos. En el año 2012 ingresé al Magister en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Durante la realización de este programa, curse asignaturas en el área de Ecología y Biología Evolutiva, además de realizar dos estadías en el extranjero dedicadas a la implementación de técnicas moleculares en restos óseos humanos antiguos. El trabajo presentado en esta tesis de Magister surge a partir del interés en la historia de los grupos originarios que habitaron América en fechas previas al contacto con Europa, motivado además por los trabajos paleogenéticos previos realizados por mi tutor, en el área de Patagonia y Tierra del Fuego.

AGRADECIMIENTOS

A la beca CONICYT para estudios de Magister en Chile y los proyectos Fondecyt #1100643 y #1140544 por contribuir al financiamiento de este trabajo. A su vez, a la Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Departamento de Postgrado y Postítulos de la Universidad de Chile, por facilitar el desarrollo de una estadía en el extranjero en el marco de esta tesis.

A los integrantes del laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución Humana, ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por tantos buenos momentos compartidos en el vagón, y en especial a Jacqueline Galimany por contribuir directamente al desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Brian Kemp, Cara Monroe, Kathleen Jud y Rodrigo De Los Santos, del laboratorio de Antropología Molecular, Washington State University, por contribuir a esta tesis al compartir sus experiencias y trabajo.

Al Centro de Geogenética, Universidad de Copenhagen, especialmente a la Dra. Paula F. Campos quien tuvo una increíble disposición y paciencia al transmitir su conocimiento.

A 7+1 por la paciencia, humor, apoyo, locura, amistad, financiamiento, consejo y sabiduría respectivamente, aunque no necesariamente en ese orden...quien sabe cual es cual y si siquiera son esas, pero gracias a tod@s de todas formas!

Finalmente quisiera agradecer a mi familia, siempre dispuesta a ayudar más allá de la comprensión.

INDICE

| | | |
|-----------------------------------|--|-------|
| Resumen | | 3-4 |
| Abstract | | 4-5 |
| Introducción | | 6-7 |
| Antecedentes | | |
| | Poblamiento americano..... | 7-10 |
| | Marcadores genéticos en América..... | 10-14 |
| | DNA antiguo: alcances y limitaciones..... | 14-20 |
| | Área de estudio: Patagonia y Tierra del Fuego..... | 20-26 |
| | Canoeros de Patagonia y Tierra del Fuego..... | 27-30 |
| Planteamiento | | |
| | Hipótesis..... | 31 |
| | Objetivos..... | 31 |
| Materiales y Métodos | | |
| | Muestras..... | 32-33 |
| | Extracción de DNA..... | 34-35 |
| | Caracterización de haplogrupos y secuenciación de región Hipervariable..... | 35-36 |
| | Análisis de secuencias..... | 36-38 |
| | Cromosoma-Y..... | 39 |
| Resultados | | 41-49 |
| Discusión | | 50-58 |
| Conclusión | | 59 |
| Bibliografía | | 60-68 |
| Material Suplementario | | 69-72 |

Lista de tablas

| | | |
|-----------|---|-------|
| Tabla 1: | Tipos de daño DNA antiguo | 16 |
| Tabla 2: | Muestras analizadas | 32 |
| Tabla 3: | Partidores de DNA mitocondrial | 38 |
| Tabla 4: | Partidores cromosoma Y (SNP, STRs) | 39 |
| Tabla 5: | Indices de diversidad molecular en muestras nativas americanas de Chile y Argentina | 41 |
| Tabla 6: | Resultados AMOVA | 45 |
| Tabla 7: | Resultados STR en cromosoma Y | 48 |
| Tabla S1: | Detalle de muestras | 69-70 |
| Tabla S2: | Test Exacto de Diferenciación Poblaciona | 71 |
| Tabla S3: | Valores de Fst entre pares de muestras obtenidos a partir de secuencias | 71 |
| Tabla S4: | Valores de Fst entre pares de muestras obtenidos a partir de frecuencias | 72 |

Lista de Figuras

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1: | Hipótesis de poblamiento de América (rutas de acceso) | 8 |
| Figura 2: | Sitios estudiados a través de aDNA en América | 14 |
| Figura 3: | Principales daños del DNA antiguo | 15 |
| Figura 4: | Modificación de secuencias según daño del DNA | 17 |
| Figura 5: | Características principales aDNA en librerías genómicas | 20 |
| Figura 6: | Principales sitios tempranos de Patagonia y Tierra del Fuego | 22 |
| Figura 7: | Distribución de grupos cazadores recolectores marinos y terrestres de Patagonia y Tierra del Fuego | 26 |
| Figura 8: | Ubicación de muestras analizadas | 33 |
| Figura 9: | DNA mitocondrial y caracterización de haplogrupos mitocondriales amerindios | 36 |
| Figura 10: | Distribución de linajes mitocondriales en muestras antiguas de Kawéskar y Yámana | 40 |
| Figura 11: | Matriz de Fst | 43 |
| Figura 12: | Dendrograma Neighbour-joining a partir de matriz Fst | 44 |
| Figura 13: | Network haplogrupo C1 | 46 |
| Figura 14: | Network haplogrupo D | 47 |
| Figura 15: | Porcentaje de haplogrupos en distintas muestras de Kawéskar (K) y Yámana (Y) | 51 |
| Figura 16: | Matriz de Fst obtenida a partir de frecuencias | 54 |
| Figura 17: | Dendrogramas Neighbour-joining a partir de matriz de Fst | 57 |

RESUMEN

Las poblaciones humanas nativas de Patagonia y Tierra del Fuego han motivado un profundo interés en el marco del poblamiento del continente americano y producto de las condiciones climáticas particulares a las que se enfrentaron. La diversidad de estos grupos en un sentido biológico, económico, lingüístico y cultural ha permitido dar cuenta de una gran variabilidad. Dentro de esta diversidad es posible identificar a dos grupos cazadores recolectores marítimos que habitaron las costas y canales patagónicos desde el Golfo de Penas al Cabo de Hornos. Estos grupos, denominados actualmente Kawéskar y Yámana, fueron tempranamente identificados como poblaciones distintas, pero han sido escasos los esfuerzos posteriores por profundizar en la historia de ambas etnias. Cualquier aproximación en ese sentido debe enfrentar las dificultades propias al trabajo con poblaciones que fueron rápidamente reducidas y relocalizadas luego del contacto con Europa, perdurando en la actualidad unos pocos descendientes. En este trabajo se pretende profundizar en el conocimiento de ambas etnias a partir del análisis de DNA antiguo utilizando marcadores de herencia uniparental. Se analizaron un total de 37 muestras para las cuales se identificaron los linajes mitocondriales y de cromosoma Y. En el caso de mtDNA, se obtuvieron sólo linajes C y D, en concordancia con otros estudios que sugieren la ausencia de A y B en poblaciones del extremo sur de Sudamérica. Específicamente, se identificaron los linajes C1, D1, D1g y D4h3a5 en ambas muestras. En Kawéskar se obtuvo un 17.64%, 5.8%, 11.76% y 58.8% respectivamente, mientras que en Yámana se identificaron los linajes C1, D1g y D4h3 en un 89.47%, 5.26 y 5.26% respectivamente. Se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos, al igual que entre ellos y otros grupos nativos de Chile y Argentina, a excepción de Kawéskar antiguo y Kawéskar moderno. Sin embargo, pese a esta diferenciación se observan sub-haplogrupos compartidos por los representantes modernos de ambos grupos y las muestras analizadas en este trabajo. Por su parte, 9 muestras de un total de 14 individuos masculinos pudieron ser caracterizados según cromosoma Y obteniendo sólo el linaje Q-M3, propio de nativos americanos. Un total de 3 STRs pudieron ser evaluados en 8 individuos, mostrando una baja variabilidad entre ellos. Los resultados sugieren una diferenciación significativa entre ambos grupos principalmente a partir de linajes mitocondriales, pese a la

proximidad geográfica, presentando además una baja variabilidad en ambos marcadores.

ABSTRACT

The native human populations from Patagonia and Tierra del Fuego have been of great interest in the context of the American peopling, particularly because of the evidence of early human presence in the area and the climatic conditions that they were subjected to. The biological, economical, linguistic and cultural characteristics of these groups have shown great variability inside the area. Within this diversity, it is possible to identify two marine hunter-gatherer groups that inhabited the Patagonian coast and channel from the Gulf of Penas to the Cape Horn. These groups, currently known as Kawéskar and Yámana, were recognized early as different populations, but the following efforts to improve the knowledge about them have been insufficient. Any approach to this subject has had to deal with the limitations of working with populations, severely reduced and relocated, post-European contact, , of which just a few descendants remain to this day. The main goal of this work is to contribute to the knowledge of both groups through the analysis of ancient DNA and uniparental genetic markers. A total of 37 samples were analyzed, identifying the main lineages for mitochondrial DNA and Y-chromosome. In the mitochondrial DNA, only C and D lineages were identified, in agreement with other studies that suggest the absent of A and B lineages in the southern south of America. Particularly for these groups, the sub-lineages C1, D1, D1g and D4h3a5 were recognized in both samples. In the Kawéskar sample, the sub-lineages were identified in a 17.64%, 5.8%, 11.76% and 58.8% respectively, while for the Yámana one the sub-lineages C1, D1g and D4h3a5 were identified in a 89.47%, 5.26% and 5.26% respectively. Significant differences were obtained between both groups, as well as between them and other native samples from Chile and Argentina, with the exception of the ancient and modern samples of Kawéskar. In spite of this differences, we observed there were sub-haplogroups shared between the modern samples of Kawéskar and Yámana and the ancient samples analyzed on this work. Meanwhile, 9 of a total of 14 male individual samples could be characterized for Y-chromosome obtained only the native lineage Q-M3. A total of 3 STRs were evaluated in 8 individuals, showing a low diversity between them. The

results suggest a significant difference between Kawéskar and Yámana, mainly because of their mitochondrial lineages, in contrast to the geographical proximity of the groups, showing a low level of genetic diversity for both markers.

INTRODUCCIÓN

Es posible entender la diversidad biológica y cultural en América a partir de tres procesos básicos: el poblamiento inicial del continente, las migraciones y flujo génico entre las poblaciones nativas previo al contacto europeo y finalmente el proceso de mestizaje con poblaciones principalmente europeas y en menor grado africanas, dependiendo del área geográfica. Particularmente, los estudios genéticos se han concentrado en marcadores de herencia uniparental, tales como DNA mitocondrial (mtDNA) y cromosoma Y, dada las ventajas en términos de análisis y considerando los procesos de mestizaje post-contacto europeo (Battaglia *et al*, 2013). Es en gran medida a partir de estos marcadores que se han caracterizado genéticamente a diversas poblaciones nativas y mestizas a lo largo de toda América (Bisso-Machado *et al*, 2012; Salzano y Sans *et al*, 2014).

La historia poblacional del extremo sur de Sudamérica (Patagonia y Tierra del Fuego) ha sido un foco particularmente importante de investigación debido a la presencia de sitios tempranos de ocupación humana en el área desde 12,000 años atrás (Miotti y Salemme, 2004). La historia de los grupos humanos que poblaron esta área previo al contacto con poblaciones europeas es poco conocida, principalmente nutrida por investigaciones en el área de Antropología Social, Etnohistoria, Arqueología y Antropología Biológica. Desde el siglo XVII el paso continuo de navíos por el Estrecho de Magallanes y canales patagónicos y posteriormente el asentamiento definitivo de poblaciones europeas, chilenas y argentinas en la zona, generó un cambio importante en los hábitos, modos de vida y salud de los grupos cazadores recolectores de la zona, disminuyendo de forma importante la población nativa (Gusinde, 1986 [1937], 1991 [1974]). Las evidencias materiales encontradas en excavaciones y prospecciones arqueológicas, salvatajes y hallazgos aislados, dan cuenta fragmentariamente de los modos de vidas y costumbres de estos pueblos, lo que se complementa con las etnografías y relatos de diversas épocas, realizados por exploradores europeos o más tardíamente por los mismos descendientes. A lo largo de esta tesis se pretende aportar al conocimiento de esta área a partir del análisis de DNA antiguo en restos óseos adscritos a dos etnias que habitaron los canales e islas de Patagonia y Tierra del Fuego, actualmente conocidos como Kawéskar y Yámana. A continuación, se indicarán

los principales antecedentes relacionados a esta tesis, ilustrando los aspectos que permitan de mejor manera dar cuenta del contexto y justificación de este trabajo.

ANTECEDENTES

Poblamiento americano

La diversidad biológica y cultural de las poblaciones nativas americanas ha sido ampliamente estudiada para comprender los procesos de poblamiento y mestizaje del continente. Las investigaciones en esta área han sido en su mayoría esfuerzos multidisciplinarios que involucran datos arqueológicos, genéticos, morfológicos, lingüísticos, culturales y medioambientales. Un temprano ejemplo de ello es el trabajo de Greenberg y colaboradores en el año 1986, quienes a partir de datos lingüísticos, morfológicos dentales y arqueológicos, sugirieron tres oleadas migratorias hacia América considerando que la diversidad observada en dichas tres dimensiones, principalmente lingüística, permitía agrupar a las poblaciones americanas en Amerindios, Na-Dene y Eskimo-aleutianos. El primer grupo correspondería a la migración inicial hacia América, la que habría ocurrido con posterioridad al Último Máximo Glacial (~24,000-13,000) hace 13 KYA (mil años atrás) aproximadamente. El modelo sugería la formación de un puente terrestre en Beringia que habría facilitado el paso desde el noreste de Siberia hacia el extremo norte de América en conjunto con un paso libre de hielo entre las masas glaciales Cordilleran y Laurentide al norte de Canadá, que permitiera el ingreso al continente (Figura 1). Las poblaciones responsables de esta primera migración se caracterizaron según el registro arqueológico por largas puntas de proyectil lanceoladas y bifaces encontrados en asociación con megafauna pleistocénica, patrón que fue denominado en conjunto como "Complejo cultural Clovis". Los otros dos grupos corresponderían a migraciones más tardías y restringidas a la costa noroeste pacífica en el caso de Na-Dene y al Ártico para los grupos Eskimo-aleutianos (Goebel et al, 2008; O'Rourke y Raff, 2010; Rothhammer y Dillehay, 2009).

La hipótesis de Greenberg y colaboradores junto con el modelo "Clovis first", básicamente limitaban el poblamiento del continente a la cultura Clovis, siendo este

proceso no anterior a 13,2 KYA (Dillehay, 2009). Sin embargo, el avance de la investigación en el área comenzó rápidamente a contradecir este modelo, dado el descubrimiento de diversos sitios en Sudamérica con fechas más tempranas al límite establecido por Clovis. Particularmente, sitios como Monte Verde en Chile fechado en ~14,5 KYA, Taima Taima en Venezuela con ~13,0 KYA y Santana de Riacho y Lapa do Boquete en Brasil, con ~14,0 y 14,1 KYA respectivamente, entre otros, daban cuenta de un poblamiento más temprano y que presentaba además una diversidad cultural distinta a la observada en el hemisferio norte. Posteriormente, evidencias arqueológicas en Norteamérica reafirmaron que el poblamiento inicial del continente habría sido anterior a Clovis, gracias a sitios como Schaefer y Hebior fechados en ~14,8 y 14,2 KYA respectivamente (Wisconsin), La Sena entre ~22,0 y 20,0 KYA (Nebraska), Lovewell con ~19,0 KYA (Kansas), Page-Ladson con ~14,0 KYA (Florida), Meadowcroft Shelter entre ~22,0 y 13,4 KYA (Pennsylvania), Cactus Hill entre ~20,0 y 18,0 KYA (Virginia), Topper con ~13,5 KYA (South Carolina) y Paisley 5 Mile Point Cave (Oregon) fechado en ~14,0 KYA (Dillehay, 2009; Kemp y Schurr, 2010). En conjunto, estas nuevas evidencias sugieren que el poblamiento americano habría ocurrido al menos hace 18,000 años atrás.

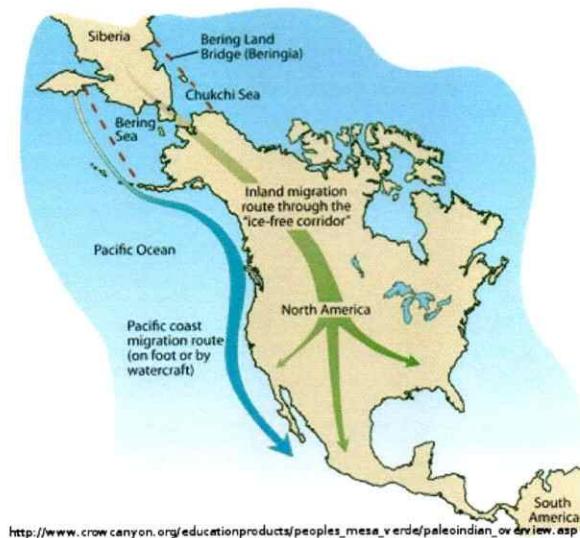


Figura 1: Hipótesis de poblamiento de América (rutas de acceso).

Los cambios en las fechas del poblamiento inicial también han repercutido en las rutas de acceso al continente. La migración a través de un corredor libre de hielo ha sido cuestionada tanto por el registro arqueológico como por estudios paleoclimáticos, siendo en definitiva una hipótesis poco concordante con un poblamiento temprano. En su lugar, el modelo de poblamiento a través de la costa pacífica es el que presenta mayor aceptación en la comunidad científica (Figura 1). Esta migración costera habría alcanzado hasta la costa chilena, sin perjuicio de otras rutas a través del interior de Sudamérica (Rothhammer y Dillehay, 2009).

En relación al número de posibles migraciones, las evidencias analizadas han sido menos concordantes entre ellas, sugiriendo tres, dos o una sola migración. Lo que plantea una u otra hipótesis se relaciona directamente con el número de poblaciones que dieron origen a la diversidad biológica de los grupos nativos americanos, como ya fue mencionado para la hipótesis de tres oleadas migratorias de Greenberg y colaboradores (1986). La hipótesis que plantea dos migraciones se fundamenta esencialmente en la variación morfológica craneana que permite agrupar la diversidad morfológica en dos grupos discretos: Paleoamericanos y Amerindios. Los paleoamericanos representarían una primera migración a través de Beringia desde el sureste asiático hace 15,000 años atrás aproximadamente, mientras que los Amerindios serían descendientes de una segunda migración en el Holoceno temprano desde el este de Asia (Neves y Pucciarelli, 1989, 1991; Pucciarelli, 2004; de Azevedo et al, 2011). Por su parte, la hipótesis de una sola migración hacia América se sustenta en datos genéticos, particularmente de marcadores uniparentales, mediante los cuales se argumenta que la diversidad genética moderna de América coalesce en una única población ancestral proveniente de Asia (Fagundes et al, 2008; de Azevedo et al, 2011). Junto con ello, se ha sugerido un período de estancia y aislamiento de las poblaciones en Beringia, previo al ingreso a América, momento en el cual se habrían acumulado variantes propias de poblaciones que ingresaron a América (Tamm et al, 2007; Fagundes et al, 2008; Mulligan et al, 2008). Es justamente la identificación de variantes genéticas sólo presentes en América y no en grupos de Asia uno de los principales argumentos a favor de una sola migración (Wang et al, 2007; Fagundes et al, 2008). Recientemente, un estudio que incluyó datos lingüísticos y cientos de SNPs a lo largo de todo el genoma de diversas poblaciones nativas, sostiene el modelo de las 3 migraciones, siendo la principal y más antigua responsable de gran parte de la

variación en nativos americanos. Respecto a las otras dos migraciones, se restringen al norte de América y se sugiere un alto grado de flujo génico entre ellas y las primeras poblaciones amerindias (Reich *et al*, 2012). En síntesis, se observa que una migración es responsable de gran parte de la variación biológica nativa en América, siendo las variaciones observadas en la actualidad producto del proceso mismo de colonización del continente y posteriores movimientos internos.

Marcadores genéticos en América

Como se expuso anteriormente, el análisis de variantes genética ha sido ampliamente utilizado para dar cuenta de las principales migraciones o movimiento en el continente, así como para explorar la diversidad a nivel regional y discutir hipótesis poblacionales locales. Algunas de las variantes analizadas corresponden a grupos sanguíneos, marcadores autosómicos (HLA, AIMS, STRs, RFLP, paneles de SNP), DNA mitocondrial (mtDNA) y cromosoma Y. Un porcentaje importante de los trabajos se han enfocado en el análisis de marcadores uniparentales, principalmente DNA mitocondrial, dadas las ventajas de su estudio. Por un lado, su herencia uniparental facilita el análisis en poblaciones con diversos grados de mestizaje, principalmente urbanas, en donde los componentes autóctonos y alóctonos a nivel genómico han sido poco explorados. Se ha visto a lo largo de América un mestizaje asimétrico en donde un mayor porcentaje de los linajes maternos (mtDNA) son amerindios, mientras que los paternos (cromosoma Y) son de origen europeo (Bisso-Machado *et al*, 2012; Salzano y Sans, 2014). Es por ello que el estudio de linajes mitocondriales como aproximación a la diversidad nativa americana ha sido extensamente utilizado. La ausencia de recombinación de estos marcadores facilita además el seguimiento de los linajes en el tiempo, dado que cada mutación se acumula y es traspasada a la siguiente generación sin eventos de recombinación que confundan su identificación a través del tiempo. Adicionalmente, se ha descrito que el genoma mitocondrial, principalmente la región hipervariable, presenta tasas de sustitución relativamente mayores que el DNA nuclear, permitiendo diferenciar haplogrupos o poblaciones que divergieron recientemente (Pakendorf y Stoneking, 2005; Underhill y Kivisild, 2007; Kemp y Schurr, 2010).

Si bien los marcadores uniparentales presentan importantes ventajas para su análisis, representan sólo una pequeña fracción de la diversidad en el genoma humano. Recientemente, el análisis masivo de marcadores nucleares (SNP y STR) en extensos conjuntos de poblaciones ha permitido ampliar el espectro de variación genética en América, contribuyendo a la identificación de los componentes genéticos propios americanos y sus interacciones previo al mestizaje con Europa y África (Wang *et al*, 2007; Reich *et al*, 2012; Gravel *et al*, 2013, Moreno-Estrada *et al*, 2014). Sin embargo, la obtención y análisis de estos datos es una área aun en desarrollo, en cuanto gran parte de la variación de diversas poblaciones nativas y mestizas a lo largo de América permanece inexplorada.

La variación presente en el genoma mitocondrial en América fue tempranamente caracterizada en linajes o haplogrupos, siendo nombrados con las letras A-D, incluyendo posteriormente el haplogrupo X pero hasta el momento restringido sólo al norte de Norteamérica (Schurr y Sherry, 1990; Torroni *et al*, 1993; Horai *et al*, 1993; Baillet *et al*, 1994; Schurr *et al*, 2004). La frecuencia de estos linajes en América muestra una distribución clinal, en donde A se encuentra en mayor frecuencia en la zona norte, disminuyendo su frecuencia hacia el sur, mientras lo contrario ocurre con los linajes C y D. El haplogrupo B no presenta una distribución clinal, aunque su presencia es mayor en ciertas zonas de Centroamérica y está virtualmente ausente en la zona norte de Norteamérica (Moraga *et al*, 2000; Rocco *et al*, 2002; Schurr *et al*, 2004; García-Bour *et al*, 2004; Moraga *et al*, 2010; De Saint Pierre *et al*, 2012). Posteriores caracterización de estos linajes mediante secuenciación de la región hipervariable o utilizando genomas completos han permitido definir subhaplogrupos ampliamente distribuidos en América tales como A2, B2, C1b, C1c, C1d y D1, mientras otros han sido identificados en menor frecuencia o en áreas geográficas específicas, tales como B2i2, C1b13, C4c, D1g, D2a, D3, D4e1, D4h3, X2a y X2g (Tamm *et al*, 2007; Achilli *et al*, 2008; Perego *et al*, 2009; De Saint Pierre *et al*, 2012; Bodner *et al*, 2012).

La región no recombinante del cromosoma Y ha sido igualmente estudiado a lo largo de todo el continente, aunque su análisis presenta ciertas dificultades debido a la drástica reducción de diversidad observada en nativos americanos y la frecuencia variable de linajes autóctonos en las poblaciones analizadas obteniendo entre un 35 a 100% de linajes nativos (Bisso-Machado *et al*, 2012; Battaglia *et al*, 2013). Se han

Identificado dos linajes principales, llamados C y Q, presentes en un 6% y 75% respectivamente. A un mayor nivel de especificidad, gran parte de la variación en cromosoma Y americano se reducen a los linajes Q-M3 o Q1a2a1a1 y C-P39 o C2b1, el primero caracterizado por la transición C → T (rs3894) y el segundo por la mutación G → A en la posición 60,565 del pseudogen ARSDP (Bortolini *et al*, 2003; Zegura *et al*, 2004; Gepper *et al*, 2011; Bisso-Machado *et al*, 2012; Battaglia *et al*, 2013). La nomenclatura asociada a ambos linajes y en general asociada a cromosoma Y continúa en constante debate, en cuanto nuevas aproximaciones permiten un análisis más exhaustivo de su variación en diversas poblaciones humanas. En términos generales, dentro de los linajes mencionados la variación de Q-M3 es la que ha sido mayormente explorada a partir de SNPs (por sus siglas en inglés "Single Nucleotide Polymorphism") y STRs ("Short Tandem Repeat"), permitiendo la caracterización de sub-linajes. Mediante SNPs se han identificado al menos 7 sub-linajes de Q-M3, mientras que al menos 15 STRs han sido analizados ampliamente a lo largo de América. De estos sub-linajes, Q1a2a1a1* es el que presenta mayor frecuencia a lo largo de América, mientras que otras variantes (Q1a2a1a1a, b, c, d, e y f) presentan distribuciones geográficamente restringidas. Los STRs usualmente estudiados son DYS19, DYS388, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458 y DYS635. Una revisión reciente de estos datos realizada por Bisso-Machado y colaboradores (2012) sugiere que la mayor parte de la variación encontrada en estos STRs es explicada a nivel intra-poblacional, mientras que 6 loci presentan variación atribuible a variables geográficas (DYS398I, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437 y DYS456).

Además de estudios en poblaciones modernas, la diversidad genética en América ha sido explorada a partir de DNA antiguo (aDNA), trabajos que se han dedicado principalmente a variantes en el mtDNA dadas las condiciones de preservación del DNA. Estos trabajos proveen condiciones únicas para profundizar en la prehistoria regional y patrones de diversidad genética del pasado (Raff *et al*, 2011). Las investigaciones en esta área se han realizado a lo largo de gran parte de América, aunque se observa un sesgo geográfico y temporal evidente relacionado a la preservación de restos humanos antiguos y la búsqueda sistemática de sitios. La mayoría de los estudios se concentran en los últimos 5,000 años, siendo los de mayor antigüedad análisis de individuos aislados. Uno de los trabajos con mayor profundidad

temporal fue publicado en 2008 en coprolitos humanos del sitio Paisley 5 Mile Point Cave (Oregon, EEUU), fechado en aproximadamente 12,300 AP (14,270-14,000 cal AP), y que permitió la identificación de los linajes A2 y B2 (Gilbert *et al*, 2008). Posteriormente, sitios del Holoceno temprano, tales como OYKC (Alaska, EEUU) fechado en 9,200 AP (~10.300 cal AP) y Wizards Beach (Nevada, EEUU) fechado en 9,225 +/- 60 AP (10,560-10,250 cal AP), han permitido la identificación de los linajes D4h3 y C1 respectivamente (Kemp *et al*, 2007; Kemp y Schurr, 2010). Recientemente, el sitio Anzick (Montana, EEUU) fechado en 10,705 +/- 35 años AP (12,707-12,556 cal yr AP) y asociado a la cultura Clovis, se cuenta como uno de los pocos trabajos a nivel genómico de aDNA en América. En términos de mtDNA, el individuo fue identificado como D4h3a5, mientras que los análisis genómicos permitieron concluir su estrecha asociación con nativos americanos actuales, identificando también el flujo génico desde el Paleolítico Superior de Siberia mediante la comparación con diversas poblaciones en Siberia y América (Rasmussen *et al*, 2014). Un trabajo aún más reciente permitió de forma excepcional la identificación del linaje D1 de un individuo depositado en una cueva submarina de México y fechado en 10,978 +/- 20 AP (12,910-11,750 cal AP) (Chatter *et al*, 2014). Estos trabajos han contribuido en la caracterización de variantes genéticas propias de América, así como en dar cuenta de su profundidad temporal. Sin embargo, su aporte es limitado al momento de poner a prueba hipótesis sobre la historia evolutiva regional. En este sentido, investigaciones de períodos más tardíos (rango de 250 a 6,000 AP) han facilitado el estudio de un mayor número de individuos (Figura 2), permitiendo con ello aportar a la prehistoria, diversidad y continuidad de las poblaciones a nivel local y a lo largo de toda América (Raff *et al*, 2011).





Figura 2: Sitios estudiados a través de aDNA en América (modificado de Balter, 2011).

DNA antiguo: alcances y limitaciones.

Como fue expuesto en la sección anterior, el DNA antiguo (aDNA) ha sido ampliamente utilizado a lo largo de América como una herramienta para aproximarse a la diversidad genética de las poblaciones tempranas que habitaron el continente, previo al mestizaje con poblaciones europeas y africanas. El alcance de estos trabajos se relaciona directamente con las condiciones de preservación del material genético y los avances metodológicos que se han realizado en el área. Los primeros trabajos en DNA antiguo fueron publicados a mediados de los años 80 por Higuchi y Pääbo usando clonación bacteriana para recuperar pequeños fragmentos de DNA de quagga, una especie extinta relacionada a la cebra, y de una momia egipcia respectivamente (Higuchi *et al* 1984; Paabo 1985, 1989). Estos trabajos, pioneros en al área, señalaron tempranamente una de las principales dificultades inherentes al paso del tiempo: la degradación del DNA. Diversos procesos contribuyen a la fragmentación del material genético y modificación de bases nucleotídicas, siendo factible recuperar fragmentos no mayores a 200 bp aproximadamente (Hofreiter *et al*, 2001).

En ausencia de una estrategia dirigida a fragmentos específicos del genoma, gran parte del material recuperado en los primeros trabajos en aDNA, correspondía a microorganismos y los resultados eran escasamente replicables. Pese a esta dificultad, se promovieron rápidamente investigaciones en aDNA de diversas especies animales y vegetales, sugiriendo que era posible obtener DNA de organismos extintos hace millones de años. El desarrollo del PCR (por las siglas en inglés de “Reacción en Cadena de la Polimerasa”) fue una gran contribución al área, permitiendo el análisis del material genético de forma más sistemática y rápida. Sin embargo, la gran sensibilidad de esta técnica dejó en evidencia el potencial de contaminación de los resultados con DNA moderno. Más aun, diversos estudios tempranos en el área fueron invalidados posteriormente, señalando que eran el resultado de contaminación humana o bacteriana o simplemente porque fueron imposibles de replicar (Hofreiter *et al*, 2001; Willerslev y Cooper, 2004; Krause, 2010).

El DNA antiguo presenta señales de daño características involucradas en la fragmentación y alteraciones de bases, las que se resumen en la tabla 1 y figura 3.

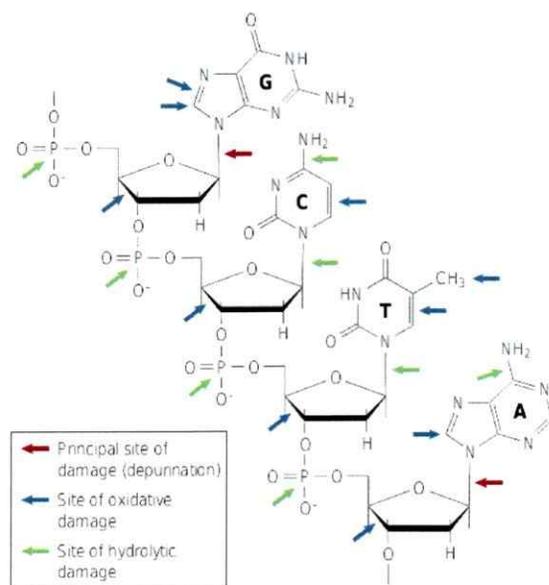


Figura 3: Principales daños del DNA antiguo (Hofreiter *et al*, 2001).

Tabla 1: Tipos de daño DNA antiguo (modificado de Rizzi *et al* 2012).

| Daño | Proceso | Efecto en molécula de DNA |
|---|---|---|
| Daño oxidativo | Ruptura de hebras (cortes de hebra simple) | Corte de enlace fosfodiéster. Depuración resultando en sitios sin base nucleotídica. Bloqueo en la acción de la polimerasa. |
| Hidrólisis | Errores de codificación (deaminación de citocinas y adeninas). | Incorporación de bases incorrectas durante la amplificación por PCR. |
| Degradación por nucleasas de microorganismos. | Ruptura de hebras | Fragmentación del DNA |
| Enlaces cruzados | Enlaces cruzados entre hebras Enlaces cruzados entre hebras y otras moléculas. | Bloqueo en la acción de la polimerasa. |

Poco después de la muerte del individuo comienza la autólisis de las células, junto con el incremento de microorganismos internos y externos, que en ausencia de los mecanismos de reparación propios de la célula, contribuyen al daño del DNA. Las alteraciones observadas con mayor frecuencia son producto del daño oxidativo e hidrolítico que afectan distintas partes de la estructura del DNA. El resultado de estas alteraciones es la fragmentación de las hebras y modificación o pérdida de bases nucleotídicas. También se ha observado la formación de enlaces cruzados entre moléculas de DNA y entre el DNA y otras moléculas, lo que finalmente interviene en las reacciones de PCR bloqueando la acción de la polimerasa (Willerslev y Cooper, 2005; Gilbert, 2006). Una gran proporción del daño oxidativo parece ocurrir por la acción de radicales libres, los que afectan a las bases nucleotídicas o a los enlaces entre azúcares, generando finalmente fragmentos de hebras simples. Sin embargo, los enlaces fosfodiéster (entre azúcares) son con mayor frecuencia objeto de daño hidrolítico, produciendo la fragmentación de las hebras. Así mismo, también se ven afectados los enlaces glucosídicos principalmente en purinas, lo que resulta en sitios sin base nucleotídica derivando posteriormente en la fragmentación de la hebra. Un tipo de daño observado con alta frecuencia en DNA antiguo es la deaminación

hidrolítica de citosinas y adeninas, lo que genera una lectura incorrecta de los sitios. El primer caso es observado con mayor frecuencia y genera un cambio de citosina a timina. La citosina deaminada es leída como uracilo, de modo que en una reacción de PCR es apareado con una timina. Los sucesivos ciclos de PCR generan el cambio de citosina a timina. Una situación similar ocurre con la adenina deaminada, que es leída como guanina y conduce a un cambio de adenina por guanina. Dada la naturaleza complementaria del DNA y según la hebra secuenciada, los cambios pueden ser leídos como C → T o G → A en el primer caso, y A → G o T → C en el segundo. Según el nivel de daño de la muestra o el fragmento que sirva de templado para la amplificación mediante PCR, en un cromatograma esto se observará como en la figura 4 (Gilbert, 2006).

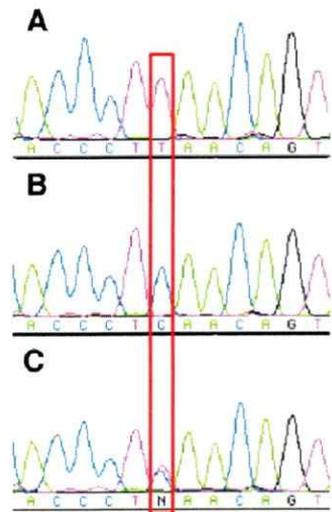


Figura 4: Modificación de secuencias según daño del DNA. El sitio destacado en el recuadro da cuenta de las posibles situaciones en caso de deaminación de citocinas. A: el número de templados modificados supera en número al templado original, obteniendo una lectura incorrecta; B: el número de templados originales, supera a los templados dañados o modificados, obteniendo una lectura correcta (citosina); C: el sitio es observado como heteroplásmico (Modificado de Gilbert, 2006).

El desarrollo teórico y metodológico en el área ha permitido avanzar no sólo en la obtención de material genético propio del organismo estudiado, sino además mejorar cuantitativa y cualitativamente esta información. Junto con rigurosas

condiciones de manejo de las muestras, protocolos de extracción y amplificación del DNA, se ha estimado un límite teórico promedio de 100.000 años de antigüedad de las muestras, aspecto en continuo debate y que varía ampliamente según las condiciones climáticas y preservación del material. Asumiendo concentraciones fisiológicas de sal, un pH neutro y una temperatura de 15°C, en aproximadamente 100.000 no existiría DNA amplificable (Hofreiter *et al*, 2001), aunque a la fecha se ha obtenido DNA de especímenes aún más antiguos (Shapiro y Hofreiter, 2014). Los climas fríos y secos parecen ser hasta ahora los que aportan con mejores resultados dada la menor acción de microorganismos y la dilatación de los procesos enzimáticos que pueden afectar la estructura del DNA. Así mismo, la rápida desecación del cuerpo, también contribuye a una mejor conservación del DNA, evitando también la acción de microorganismos (Willerslev y Cooper, 2005).

En términos prácticos, diversas especies han sido estudiadas mediante aDNA, siendo algunas de las más antiguas homíninos extintos como Neanderthal (90.000 años), un individuo encontrado en Atapuerta, España, fechado en 300.000 años para el cual se cuenta sólo con DNA mitocondrial y un individuo proveniente de la cueva Denisova al sur de Siberia de aproximadamente 70.000 años; además de especies del género *Ursus* (120.000) y *Equus* (700.000), siendo este último el de mayor antigüedad y controversia (Reich *et al*, 2010; Meyer *et al*, 2012; Meyer *et al*, 2013; Orlando *et al*, 2013; Shapiro y Hofreiter, 2014).

Dadas las condiciones de preservación del DNA, la mayor parte de los análisis genéticos en antiguo se han realizado en base a DNA mitocondrial o cloroplástico, analizando regiones pequeñas o incluso genomas completos, pero secuenciado en fragmentos no superiores a 200bp. Si bien se ha descrito que las histonas podrían presentar cierto grado de protección al daño en el genoma nuclear, el gran número de copias del genoma mitocondrial (entre 100 a 10000) por célula favorece su análisis (Willerslev y Cooper, 2005; Gilbert, 2006; Krauser, 2010). Además del mtDNA, los fragmentos analizados bajo metodologías tradicionales de PCR y secuenciación se han enfocado en genes con alto número de copias, tales como genes ribosomales (Krauser, 2010). De lo contrario, se requiere una gran cantidad de DNA y por lo tanto de muestra, lo que en muchos casos no es posible debido al carácter destructivo de los análisis y la condición única o fragmentaria de las muestras.

Los avances en materia de secuenciación han tenido un gran impacto en los estudios paleogenómicos, dada la posibilidad de analizar genomas completos de una gran diversidad de especies y a un costo cada vez menor. Los primeros intentos de secuenciar genomas completos dieron cuenta del bajo porcentaje endógeno del DNA extraído. Gran parte del DNA purificado corresponde a bacterias o a contaminación con DNA moderno, el que puede estar representado en porcentajes superiores al 90% (revisado en Krause, 2010). Considerando esta situación, se han desarrollado técnicas que permiten la captura o enriquecimiento del DNA estudiado con el fin de maximizar el proceso de secuenciación y con ello la profundidad del genoma (Carpenter *et al*, 2013). En análisis de estos genomas da cuenta de dos características básicas, señaladas en la figura 5. En primer lugar, se ha observado que el tamaño de los fragmentos obtenidos es en promedio de 70 bp, lo que puede variar según la preservación de la muestra, el protocolo de extracción del DNA y preparación de librerías. Además, es de esperar un patrón de daño característico como el señalado en la figura 5B: debido a la deaminación de citosinas y fragmentación del DNA, se observa un incremento en la proporción de cambios C>T en el extremo 5' de los reads, mientras que los cambios G>A incrementan hacia el extremo 3' (Briggs *et al*, 2007). Ambas características reflejan el daño del DNA antiguo y son ampliamente utilizadas como un primer control de autenticidad de los datos.

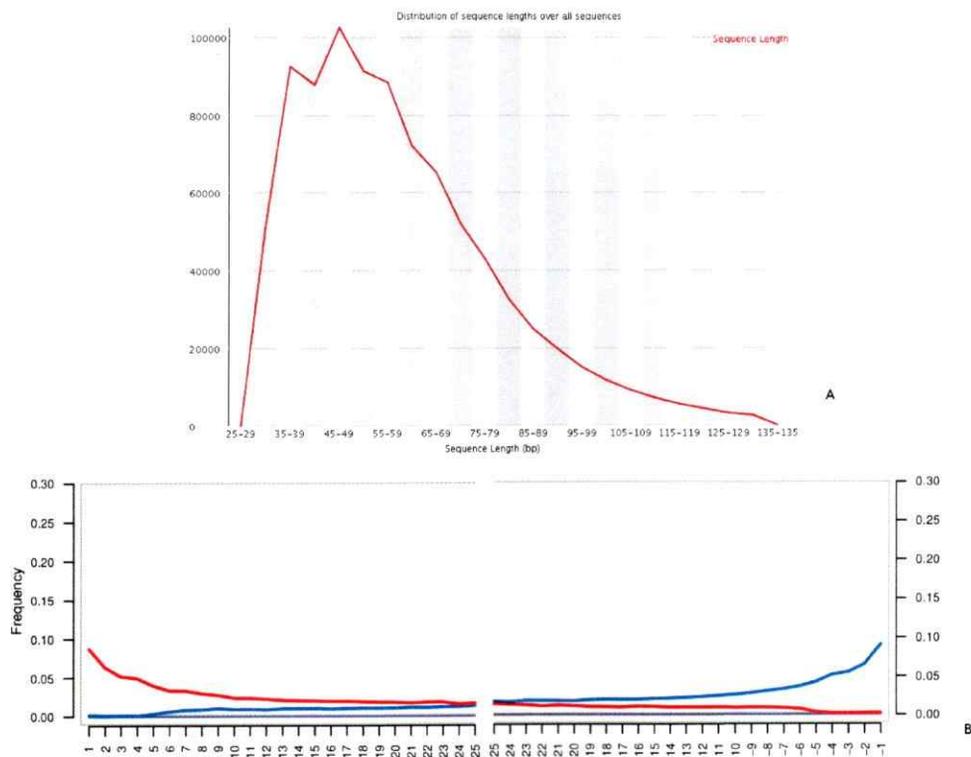


Figura 5: Características principales aDNA en librerías genómicas. La figura A muestra la distribución de reads o fragmentos obtenidos en secuenciación Illumina según su tamaño. La figura B indica el patrón de daño característico del aDNA, a la izquierda en el extremo 5' y hacia la derecha el extremo 3'. En rojo se indican los cambios C>T y en azul los G>A.

Area de estudio: Patagonia y Tierra del Fuego.

La historia poblacional del extremo sur del continente (Patagonia y Tierra del Fuego) ha sido de particular interés principalmente por la temprana y constante ocupación de la zona. Considerado en un contexto general del poblamiento del continente, esta región es particularmente atractiva ya que se han encontrado algunas de las evidencias de ocupación humana más tempranas del continente. Esta condición ha permitido articular diferentes hipótesis respecto a las rutas y tiempos del poblamiento de América que enfatizan procesos tempranos y relativamente rápidos de ocupación (Dillehay, 2009; Bodner *et al*, 2012; Reich *et al*, 2012). Por otro lado, en menor medida se ha debatido en torno a las condiciones climáticas particulares a las

que se vieron enfrentados los habitantes de la zona y su relación con el desarrollo de estrategias culturales adaptativas o respuestas biológicas al estrés ambiental (Hernández *et al*, 1997; Pearson y Millones, 2005; Gonzalez-José *et al*, 2004; Pucciarelli, 2004).

Considerando el área de Patagonia y Tierra del Fuego, tanto en Chile como Argentina, desde los 42°S hasta el Cabo de Hornos (56°S), las evidencias de ocupación humana más tempranas datan de hace aproximadamente 12,000 años atrás, durante la transición Pleistoceno-Holoceno (entre 13-8,000 años atrás), y se concentran en las cuencas andinas de la vertiente pacífica, la cuenca del Río Deseado (Argentina) y las cuencas magallánica-fueguinas (Figura 6) (Miotti y Salemme, 2004; Borrero, 2008). Estos primeros grupos humanos eran cazadores recolectores terrestres, consumidores principalmente de guanacos y fauna extinta. El ingreso de estas poblaciones a la región habría ocurrido una vez que las condiciones climáticas también lo permitieran dado que esta zona se encontraba parcialmente cubierta de hielos en fechas previas (Hester, 1966; Coronato *et al*, 1999; Piana y Orquera, 2009). El Último Máximo Glacial, período definido entre 19,000 y 10,000 años AP (Scheinsohn, 2003), se caracterizó por cambios significativos y recurrentes de las condiciones climáticas globales, con una tendencia a períodos más cálidos y el retroceso de las masas glaciales. Los primeros pobladores de la región debieron enfrentar un gran variabilidad ambiental inicial que habría generado importantes cambios en la biota y paisaje de Fuego-Patagonia (Miotti y Salemme, 2003). Estudios paleoclimáticos sugieren un aumento de las temperaturas durante este período en conjunto con eventos fríos breves, siendo el último de ellos (12-10,000 años AP) análogo al Younger Dryes de Norteamérica. En una primera instancia el paisaje habría estado dominado por un ambiente de tundra, hasta que el retroceso glacial facilitó el desarrollo de bosques y una estepa arbustiva. Al mismo tiempo, la presencia de un puente terrestre en el estrecho de Magallanes producto de la glaciación, permitió el contacto y paso fluido entre el Continente y la Isla Grande. Además, la línea de costa Atlántica se encontraba decenas de kilómetros hacia el este, dejando una importante área de tierra expuesta. Con el derretimiento de las masas glaciales y consecuente aumento del nivel del mar, finalmente la Isla Grande de Tierra del Fuego quedó separada del continente (hace aproximadamente 8,000 años AP), estabilizándose los límites costeros actuales hacia el 6,000 AP (Coronato *et al*, 1999; Scheinsohn, 2003).

Las poblaciones nativas que habitaron Patagonia y Tierra del Fuego pueden caracterizarse ampliamente según sus estrategias de subsistencia en: cazadores recolectores terrestres, cazadores recolectores marinos y grupos mixtos. La variabilidad económica asociada a la explotación de distintos recursos animales y vegetales se encuentra relacionada a dos gradientes climáticas en sentido norte-sur y oeste-este de disminución de las temperaturas y precipitaciones respectivamente, en relación también con el efecto producido por la cordillera de los Andes (Barceló *et al*, 2009; Orquera *et al*, 2011). Hacia el noreste, se encuentran las amplias planicies y tierras bajas que presentan ambientes menos fríos y más secos, habitadas mayoritariamente por grupos cazadores recolectores terrestres (principalmente de guanaco). Por su parte, la zona suroeste es más estrecha, lluviosa y boscosa, con una costa abrupta e irregular caracterizada por numerosas islas y archipiélagos. Esta última región fue habitada por diversos grupos cazadores recolectores que desarrollaron una fuerte dependencia a los recursos marinos. Todas estas poblaciones fueron nómades, organizadas en grupos familiares pequeños que mantuvieron estrategias de caza y recolección hasta el contacto europeo.

La clasificación de estos grupos de acuerdo a sus estrategias de subsistencia también permite establecer un eje temporal. Los primeros grupos humanos que poblaron Patagonia y Tierra del Fuego eran cazadores recolectores terrestres, cuyos principales recursos alimenticios fueron animales Pleistocénicos actualmente extintos, guanacos, ñandúes y mamíferos pequeños. Las evidencias de consumo de recursos costeros en este contexto no permiten sostener una explotación intensiva y especializada del área litoral (Plana y Orquera, 2009). Recién hacia el 6000 AP (Holoceno Medio) se comienzan a observar las primeras evidencias de adaptación al litoral, expresadas en el uso intensivo de recursos marinos y asociadas al desarrollo de dos importantes innovaciones: arpones de puntas desmontables y canoas. Las evidencias tempranas de adaptaciones al litoral provienen de tres núcleos: Canal del Beagle, Estrecho de Magallanes-mar de Otway y Chiloé. La mayoría de los sitios corresponden a conchales que sugieren una economía basada en pinnípedos, aves marinas, recolección de mariscos y pesca en menor proporción (Orquera *et al*, 2011). El origen de esta adaptación es poco claro, aunque se sugieren dos hipótesis principales: 1) origen independiente en Chiloé y un núcleo septentrional, probablemente en los alrededores del estrecho de Magallanes y Mar de Otway; y 2) origen en extremo

septentrional y posterior difusión hacia el norte (revisado en Orquera *et al*, 2011). El desarrollo de esta adaptación dependió en gran medida de cambios medioambientales que permitieran la extensión de áreas boscosas, proveedoras de los recursos esenciales para la elaboración de canoas y arpones. Esto habría ocurrido cerca de 1,000 años antes en el Estrecho de Magallanes-seno Otway (7,900 AP) *versus* el Canal Beagle (6,700 AP), lo que sumado a la discontinuidad tecnológica de esta segunda región permite sugerir que el desarrollo de una adaptación marina comenzó en la región próxima al Estrecho de Magallanes. Las evidencias arqueológicas más tempranas de esta zona datan del 6,350 AP (sitio Punta Santa Ana) al 5,500 AP (sitios Bahía Buena y Bahía Colorada en Estrecho de Magallanes y mar de Otway respectivamente), y han sido denominadas colectivamente como "cultura Englefield". En períodos tempranos, este conjunto se caracterizó por la industria lítica en obsidiana verde y una diversa industria en hueso de mamíferos marinos y aves. En períodos posterior se observa una disminución importante de la obsidiana verde y la diversificación de la industria de hueso en el registro arqueológico, mientras que prosperan largas puntas bifaciales de bordes dentados. Sin embargo, pese a estos cambios, la tecnología de canoeros tardíos sugiere una continuidad con sitios tempranos del seno Otway, seno Skyring y Estrecho de Magallanes. Por su parte, el área del Canal Beagle se caracteriza en sus contextos tempranos (desde 6,400 AP) por una alta proporción de instrumentos óseos y una escasa talla lítica. En períodos más tardíos se encuentran grandes puntas de lanzas hechas en vulcanita y en los últimos dos milenios aumenta la proporción de puntas de tamaño medio y pequeño, lo que indirectamente ha sido interpretado como presencia de arco (Orquera, 2005; Orquera y Piana, 2006; Orquera *et al*, 2011). Finalmente, el núcleo de Chiloé no presenta evidencias claras de adaptación litoral antes del 5,000 AP, principalmente en los sitios Puente Quilo-1 (noroeste de Chiloé) y Piedra Azul (seno de Reloncaví, sur de Puerto Montt). En ambos sitios, aunque particularmente en Puente Quilo-1, se ha identificado una industria lítica muy variada, tanto en formas como en materiales utilizados (obsidiana negra grisacea, riolita, madera petrificada, caldedonia y andesitas, entre otros), así como artefactos de hueso en períodos tardíos de ocupación. Los sitios en el área de Chiloé dan cuenta de un mayor énfasis en el consumo de mariscos y peces, en oposición a los núcleos del archipiélago Patagónico y Fueguino en donde se infiere un mayor énfasis en la caza de mamíferos marinos (Legoupil *et al*, 2007).

Las etnias descritas por cronistas y etnohistoriadores fueron también clasificadas según sus estrategias de subsistencia. Es así como dentro de los grupos cazadores recolectores terrestres se reconocen a las etnias Tehuelche en la pampa argentina y Selk'nam y Haush en Tierra del Fuego. Por su parte, los grupos de adaptación costera se denominaron de norte a sur como Chono, Kawéskar y Yámana (Figura 7). Estos grupos establecieron contacto con navegantes europeos por primera vez en 1526, aunque ya en 1520 Fernando de Magallanes hubiese inferido su presencia por los fuegos que le dieron el nombre a "Tierra del Fuego". Sin embargo, durante los siglos XVI y XVII la mayor parte de los barcos que atravesaron los canales australes lo hicieron básicamente con fines expeditivos y comerciales, siendo las descripciones de los habitantes nativos del área muy breves y anecdóticas. Recién durante el siglo XVIII comenzaron las expediciones de carácter científico, dedicadas a describir los aspectos geográficos, ambientales y humanos de la zona. Posteriormente, durante la segunda mitad del siglo XIX se establecieron las misiones religiosas (anglicanas y salesianas) cuyo objetivo era reunir a los distintos grupos nativos y adoctrinarlos en la cultura hegemónica europea, lo que en conjunto con bases militares e incipientes asentamientos en el área, tuvieron un importante impacto en la salud y modos de vida de estas etnias (Gusinde, 1951). La etnografía más extensa de estos grupos fue realizada por Martín Gusinde entre los años 1918 y 1924, e incluyó a Selk'nam, Kawéskar y Yámana. Si bien durante la época en la que Gusinde realizó estos trabajos los modos de vida tradicionales de estos grupos habían sido considerablemente alterados, su investigación permitió en gran medida dar cuenta de las características básicas de cada etnia en una extensa publicación de 9 tomos en donde aborda la historia y hábitat, vida económica, cultural material, organización social, aspectos religiosos y lenguaje de cada grupo (Gusinde, 1986 [1937], 1991 [1974]). Posteriores investigaciones se han realizado mayoritariamente en el área de Arqueología y Bioantropología.

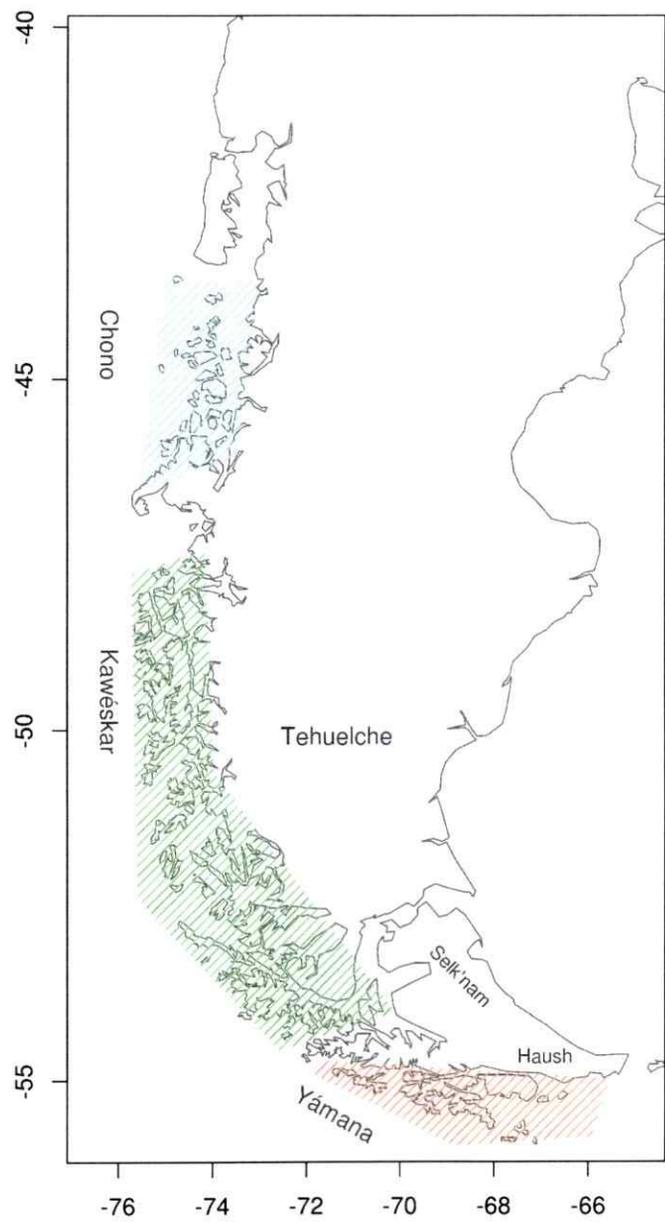


Figura 7: Distribución de grupos cazadores recolectores marinos y terrestres de Patagonia y Tierra del Fuego.

Canoeros de Patagonia y Tierra del Fuego

Como ha sido señalado, las evidencias arqueológicas sugieren la presencia de grupos adaptados al litoral hacia el 6000 AP en las proximidades del Estrecho de Magallanes, Mar de Otway y Canal Beagle. En Chiloé las evidencias son más tardías, pero no se descarta su presencia en períodos más tempranos. La relación ancestro-descendiente de estas poblaciones con los grupos históricos no es directa, pero comparaciones tecnológicas sugieren una continuidad. Pese a la ausencia de canoas en el registro arqueológico, probablemente debido a problemas de conservación, los animales consumidos sugieren su presencia desde fechas tempranas. Mayor evidencia existe respecto a arpones y puntas de proyectil líticas o de hueso, principalmente estas últimas.

En el grupo de canoeros australes es posible diferenciar al menos tres, conocidos de norte a sur como Chono, Kawéskar y Yámana. El primero se encuentra virtualmente extinto desde el siglo XVIII, siendo escasamente descrito en la literatura. Por su parte, en tiempos históricos, se estimó que el tamaño de las poblaciones más australes alcanzaba 5,000 en Kawéskar y 3,000 en Yámana, y hacia mediados del siglo XX se registraban cerca de 250 y 50 individuos respectivamente (Martinic, 1989; Gusinde 1986 [1937], 1991 [1974]).

El etnólogo alemán Martín Gusinde, realizó durante principios del siglo XX un registro etnográfico de ambas etnias. Pese a que estos grupos ya no vivían según sus modos de vida tradicionales, Gusinde procuró profundizar en ellos a partir de los relatos de los descendientes de ambas etnias. De acuerdo a lo descrito por Gusinde en sus publicaciones de 1937 y 1974, culturalmente Kawéskar o Alakaluf y Yámana o Yaghan presentaban una gran similitud asociada a sus modos de vida cazadores recolectores marinos, aunque en términos lingüísticos mostraban diferencias importantes que hacía ambas lenguas mutuamente ininteligibles. La distribución geográfica de Kawéskar abarcaba desde el Golfo de Penas por el norte hasta la Península de Brecknock en el sur, diferenciándose dialectualmente tres grupos en esta extensión separados de norte a sur por el Canal Nelson y el Estrecho de Magallanes. Por su parte, Yámana recorría el territorio desde la Península Brecknock al norte hasta el Cabo de Hornos al sur, en donde 5 grupos dialectuales fueron identificados: (1) central: canal Beagle, incluyendo la Isla Navarino, el canal Muray y la isla Hoste; (2)

occidental: al este de Puerto Williams, isla Gable, Picton, Nueva y Lennox; (3) oriental: en el canal Beagle desde punta Divide hasta la península Brecknock ; (4) Islas Wollaston o meridional: el archipiélago del Cabo de Hornos; y (5) sudoccidental: desde Bahía Cook hasta falso Cabo de Hornos (Gusinde, 1986 [1937], 1991 [1974]; Barceló *et al*, 2011).

Respecto a la estructura social de Kawéskar y Yámana, su organización era básicamente en grupos familiares (padres e hijos), siendo las reuniones de dos o más familias poco frecuentes y reducidas a celebraciones o aprovechamiento de recursos alimenticios. No existía dentro de estos grupos una jeraquía más allá de la familia, siendo cada grupo familiar autosuficiente e independiente. Eran en términos estrictos monógamos, aunque en algunas ocasiones se describieron casos de poligamia en donde una viuda o hermana se unía a un grupo familiar, situación descrita principalmente en Yámana. La dieta era esencialmente marina, con escasos aportes vegetales o animales terrestres (guanaco o huemul). Los utensilios utilizados son concordantes con este tipo de dieta, siendo la canoa de corteza de vital importancia y similar entre ambos grupos. Junto con ello, Gusinde describió diversos arpones con puntas de hueso y asta de madera, utilizados para la caza de pinnípedos. Usualmente estas puntas, de uno o dos dientes, se confeccionaban en hueso de ballena, aunque en su ausencia se utilizaban huesos de pinnípedos. Puntas más pequeñas o con bordes serrados se usaban en la fabricación de lanzas para la caza de aves o peces. Otro utensilio descrito tempranamente es la honda, manufacturada con cuero y tendones, y utilizada ampliamente también por cazadores terrestres. Sólo en el caso de Kawéskar se describió la presencia de redes de pesca fabricadas con tendones y el garrote de madera para la caza de pinnípedos. Se ha sugerido también el uso de arco y flecha, aunque en menor proporción que en Selk'nam, siendo en algunos casos producto del intercambio entre etnias.

Los individuos de ambas etnias usaban escasa vestimenta, usualmente reducida a una piel en la espalda que llegaba hasta la cintura. Cubrían su cuerpo con grasa de pinnípedo y solían usar pintura corporal (negra, roja o blanca), principalmente facial, aunque al parecer restringida a situaciones especiales como celebraciones o funerales (Fiore, 2006). Otros adornos corporales comunes entre ambos grupos eran brazaletes de cuero y collares de caracoles, mientras que en Kawéskar también se observaron de caña y hueso (Gusinde, 1986 [1937], 1991 [1974]).

Desde un punto de vista biológico, se han analizados dos aspectos principales de estos grupos: la variación craneana y la diversidad genética a partir de marcadores de herencia uniparental, principalmente mtDNA. Las primeras descripciones morfológicas craneanas de individuos de Patagonia y Tierra del Fuego destacaban su robusticidad craneofacial y forma dolicocefala en comparación con grupos nativos a lo largo de América. En base a estas características y en análisis a nivel continental, se plantearon hipótesis en donde se sugería que estos grupos eran descendientes de los pobladores más tempranos del continente. Junto con ello, la caracterización de dos morfologías craneanas en asociación al mismo número de poblaciones que hipotéticamente habrían colonizaron América en distintas épocas, relacionaron nuevamente la diversidad de fuego-patagonia al poblamiento temprano del continente (revisado en Pucciarelli, 2004). Sin embargo, otros estudios han sugerido que estas dos morfologías craneanas representan más bien dos extremos de una distribución, compartiendo ambas una misma población ancestral (González-José *et al*, 2008). En lo que respecta a las relaciones entre los grupos nativos de Patagonia y Tierra del Fuego, el estudio de variables craneométricas en poblaciones extintas permite diferenciar a las etnias terrestres de las canoeras, sin presentar diferencias significativas dentro de estos grupos. Por otro lado, en un contexto global los grupos de Fuego-Patagonia forman un solo cluster diferenciado de otras poblaciones nativas de América, sugiriendo un mismo origen ancestral. La variación observada entre las etnias de la región sería el resultado de un proceso de diferenciación tardío, y no el producto de orígenes distintos (Hernández *et al*, 1997; González-José *et al*, 2004; Pérez *et al*, 2007). Lo mismo se ha sostenido a partir del análisis de mtDNA y cromosoma Y en poblaciones actuales y extintas (Lalueza *et al*, 1997; García-Bour *et al*, 2004). En el sur de Sudamérica se ha observado una alta frecuencia de los linajes C y D, tanto que en algunas poblaciones más australes sólo se han identificado dichos haplogrupos (e.g. Chono, Kaweskar, Yámana y Selk'nam). El predominio de estos linajes es consistente con el cline geográfico norte-sur de los principales linajes mitocondriales señalado en la sección anterior, siendo la distribución geográfica de estos linajes mayoritariamente atribuida a los procesos de deriva y bajos tamaños poblacionales que caracterizaron el proceso de poblamiento del continente (García *et al*, 2006; Moraga *et al*, 2010). En el linaje C, se ha identificado básicamente C1, mientras que en D, se han identificado los sub-haplogrupos D1g y D4h3 (García *et al*, 2006). Además se observa una mayor

frecuencia de D en Kawéskar y C en Yámana, aunque no se ha estimado ni discutido esta posible diferenciación (Lalueza *et al*, 1997). Por su parte, sólo se cuenta con un estudio de cromosoma Y a la fecha, en donde 45% (9) de los individuos analizados presentaron amplificados para al menos uno de los STRs incluidos en el trabajo (DYS434, DYS437, DYS439, DYS393, DYS19, DYS389I, DYS389II, y DYS388), mientras que 5 individuos presentan claramente la mutación característica del linaje Q-M3 (García-Bour *et al*, 2004).

La utilización de marcadores de herencia uniparental ha demostrado ser una herramienta útil para aproximarse a la historia micro-evolutiva de las poblaciones humanas, especialmente en el caso del DNA mitocondrial. Tal como hemos visto, aun más relevante ha sido la implementación de este marcador en el análisis de restos óseos antiguos, donde el daño del DNA producto del tiempo y factores ambientales dificulta la obtención de DNA nuclear (Willerslev y Cooper 2005). En el contexto de poblaciones nativas americanas cuyos modos de vida fueron tempranamente alterados y sus poblaciones seriamente disminuidas, la aproximación desde DNA de restos antiguos puede proporcionar valiosa información respecto a su historia. Particularmente en el caso del extremo sur, muchas de las etnias ya se encuentra extintas o perdura en la actualidad un reducido número de descendientes. En este trabajo se espera abordar la variabilidad genética a partir de DNA mitocondrial y cromosoma Y, de dos grupos cazadores recolectores marítimos que habitaron la región más septentrional de la costa pacífica: Kawéskar y Yámana. Ambos grupos desarrollaron estrategias especializadas de caza y recolección marina, aunque presentan diferencias: a nivel de distribución geográfica, aspectos culturales y lenguaje. Otros trabajos han empleado metodologías similares, pero solo de un reducido número de individuos y a nivel de haplogrupo en el caso del mtDNA (Lalueza *et al*, 1997; García-Bour *et al*, 2004). La aproximación de este trabajo estará enfocada en responder las siguientes preguntas: ¿Es posible diferenciar a los grupos cazadores recolectores marinos de Patagonia y Tierra del Fuego (Kawéskar y Yámana) a partir de linajes mitocondriales específicos? ¿Cuáles son los linajes de cromosoma Y presentes en grupos tardíos de cazadores recolectores marinos?

HIPÓTESIS

Existen diferencias entre los grupos cazadores recolectores marinos de Patagonia y Tierra del Fuego (Kawéskar y Yámana) a nivel de linajes de herencia uniparental, en concordancia con la diferenciación cultural y geográfica de ambas etnias.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si existen diferencias entre los grupos cazadores recolectores marinos de Patagonia y Tierra del Fuego (Kawéskar y Yámana) a nivel de linajes de herencia uniparental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) Identificar los linajes mitocondriales específicos a partir de restos óseos tardíos de cazadores recolectores marinos (etnias Kawéskar y Yámana), mediante PCR-RFLP y secuenciación de la región control del mtDNA (D-loop).

ii) Identificar los linajes de Cromosoma Y en restos óseos históricos de cazadores recolectores marinos de Patagonia y Tierra del Fuego (Kawéskar y Yámana) mediante secuenciación de regiones con polimorfismos propios de los linajes descritos en la literatura.

iii) Determinar si existen diferencias entre los grupos cazadores recolectores marinos de Patagonia y Tierra del Fuego (Kawéskar y Yámana) a nivel de haplotipos mitocondriales y cromosoma Y.

iv) Comparar a nivel de haplotipos (mtDNA y Cromosoma Y) a los cazadores recolectores marinos de Patagonia y Tierra del Fuego con otros grupos actuales y extintos sudamericanos obtenidos desde la literatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron un total de 37 muestras correspondientes a restos óseos humanos asociados a las etnias Kawéskar y Yámana (detalle en tabla 2). Tres de las muestras adscritas a Kawéskar fueron previamente analizadas por el proyecto Fondecyt #11060442 dirigido por el Dr. Mauricio Moraga. Todos los restos forman parte de las colecciones bioantropológicas depositadas en el Instituto de la Patagonia (Punta Arenas) y Museo Martín Gusinde (Puerto Williams), provenientes de hallazgos aislados y/o rescates arqueológicos en la región. La asignación étnica de las muestras se corresponde con la ubicación geográfica y distribución histórica de cada etnia.

Tabla 2: Muestras analizadas.

| Asignación | Instituto | N | Total |
|-------------------|---------------------------|----------|--------------|
| Kawéskar | Instituto de la Patagonia | 17 | 17 |
| Yámana | Instituto de la Patagonia | 10 | 20 |
| | Museo Martín Gusinde | 10 | |
| | | | 37 |

Las muestras fueron colectadas en años anteriores y se encontraban almacenadas en un laboratorio especialmente acondicionado para el análisis de restos óseos antiguos. Previo a la extracción de DNA y sólo en el caso de piezas dentales, se realizó un registro fotográfico exhaustivo y moldes de resina que fueron regresados a las instituciones que facilitaron las muestras. Considerando la información referencial entregada por el Instituto de la Patagonia y Museo Martín Gusinde, en conjunto con la revisión de publicaciones asociadas a algunas de las muestra analizadas en este trabajo, fue posible estimar en la mayoría de los casos su proveniencia geográfica, según se observa en la figura 8. Sólo 6 muestras incluidas en este trabajo tiene fechados: Islote Tesner, con 2000 AP; Yekchal 89013, con 1300 AP; Punta Santa María, con 900 AP; Englefield, con 1700 AP; Cueva de la Cruz, con 250 AP; y Canal Maule-1, con 920 AP (Moraga *et al*, 2010).

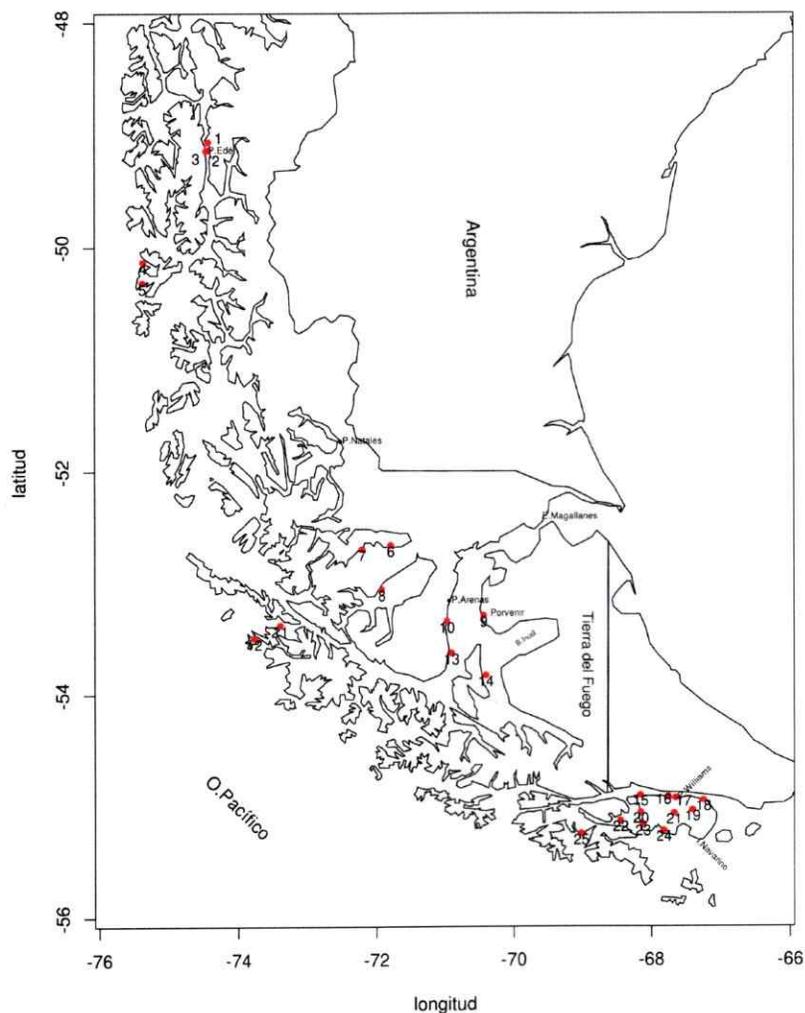


Figura 8: Ubicación de muestras analizadas. El mapa señala la ubicación aproximada de los sitios de donde provienen las muestras. 1: Canal Messier (49077); 2: Puerto Natales (50107, 50109); 3: Yekchal (89013); 4: Cueva Estrecho Trinidad (33832-33-34); 5: Cueva de la Cruz (D379); 6: Ponsonby (54889); 7: Estancia Lola (54890); 8 Englefield (54891); 9: Bahía Chilota (73722); 10: Punta Santa María (77753); 11: Canal Abra (55884); 12: Canal Maule-1 (58272); 13: Rey Felipe 49076; 14: Islote Tesner; 15: Santa Rosa (OH014); 16: Isla Navarino (27007); 17: Isla Navarino (Lauta 2-288, Pto. Luisa 6790, Pto. Williams 12489-90); 18: Caleta Eugenia (OH015); 19: Museo Martín Gusinde-No Identificadas (OH); 20: Wulaia (OH023); 21: Isla Navarino-No identificadas (1863, 849, 850); 22: Isla Mascart (OH023); 23: Río Douglas (OH030a-b); 24: Seno Grandi (6796); 25: Canasaca Hoste (6788).

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó sobre muestras de hueso o diente en base al protocolo desarrollado en Moraga y colaboradores, 2010. Complementariamente se realizaron extracciones utilizando un segundo protocolo en base a columnas de sílica, utilizando un kit comercial (QUIAGEN) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con el objeto de eliminar los contaminantes superficiales, las muestras fueron sumergidas en hipoclorito de sodio a concentración comercial (4.5-6%) durante 15 minutos. Posteriormente, las muestras fueron lavadas repetidas veces con agua bidestilada para remover el hipoclorito. El protocolo de extracción involucró la desmineralización de la muestra, proteólisis con proteinasa-K, extracción orgánica y precipitación en isopropanol. En primer lugar, las muestras fueron colocadas en tubos de 15 ml e incubadas en EDTA 0.5M pH 8.0 durante 48 horas a temperatura ambiente con agitación constante (15 ml de EDTA por cada gramo de hueso o diente). Luego se agregó proteinasa-K hasta una concentración final de 0.2 mg/mL y las muestras fueron incubadas a 53°C con agitación constante durante 16 horas. La eliminación de proteínas y otros componentes celulares se realizó mediante dos extracción de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA fue precipitado con isopropanol en presencia de acetato de amonio (5M) durante una noche a temperatura ambiente. Finalmente el DNA fue lavado en etanol (70%) y resuspendido en 50-100 µL de agua bidestilada estéril. Cada set de extracción incluyó 5 muestras y un control de extracción para evaluar posibles contaminantes durante el proceso de extracción.

La extracción con sílica se realizó utilizando un kit comercial (MinElute PCR Purification Kit, Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor, con algunas modificaciones. Posterior a la desmineralización y digestión con proteinasa-K, se utilizaron filtros Amicon (30kDa) para concentrar la muestra hasta 250 µL aproximadamente. Luego la muestra fue mezclada con 13 volúmenes de buffer de unión (binding buffer) y centrifugada utilizando las columnas incluidas en el kit. La columna fue posteriormente lavada con 600 µL del buffer de lavado. Finalmente se agregaron 100 µL del buffer de elusión y luego de incubar por 15 minutos a 37°C, la muestras fue centrifugada a 16.000 rpm por un 1 minuto y almacenada a 4°C. Al igual

que en el protocolo anterior, un set de extracción incluyó 5 muestras y un control de extracción.

Todas las extracciones y preparaciones de PCR se realizaron en un laboratorio dedicado exclusivamente al análisis de restos antiguos (Laboratorio de Antropología Molecular), separado del laboratorio de DNA actual. Las superficies del laboratorio son limpiadas con hipoclorito de sodio e irradiadas con luz UV diariamente. Los materiales utilizados son desechables y los equipos son de uso exclusivo del laboratorio de DNA antiguo. Toda manipulación de las muestras se realizó bajo una campana de flujo laminar. El laboratorio cuenta además con un sistema de inyección de aire calidad HEPA. Un set de las muestras fue analizado por duplicado en otro laboratorio (Laboratorio de DNA antiguo Dr. Kemp, Washington State University) para confirmar el carácter endógeno del DNA y replicabilidad del análisis (indicado en Material suplementario).

Caracterización de haplogrupos y secuenciación de Región Hipervariable

Las muestras fueron caracterizadas de acuerdo a los cuatro haplogrupos mitocondriales amerindios A, B, C y D según lo descrito en Torroni *et al*, 1993. Los haplogrupos A, C y D se caracterizan por la pérdida o ganancia de un sitio de corte de las enzimas de restricción, mientras que el haplogrupo B se caracteriza por una delección de 9 bp (figura 9) (Torroni *et al*, 1993).

La caracterización inicial de las muestras se realizó mediante una reacción de PCR para cada haplogrupo (4) utilizando los partidores señalados en la tabla 3. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l que incluyó: 3 μ l del DNA extraído, 2 unidades de polimerasa Go Taq Hot Start (Promega), 2.5 μ l de buffer 5x incluido con la enzima, 200 μ M de cada dNTPs, 25 pmoles de cada partidor y 100 μ g de BSA. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%. Los amplificados fueron luego analizados mediante enzimas de restricción, excepto en el caso del haplogrupo B, caracterizado por una delección de 9 pares de bases. Las enzimas utilizadas fueron Hae III para el haplogrupo A, Hinc II para C y Alu I para D (Torroni *et al*, 1993). Los resultados de la digestión fueron visualizados en geles de agarosa al 3%.

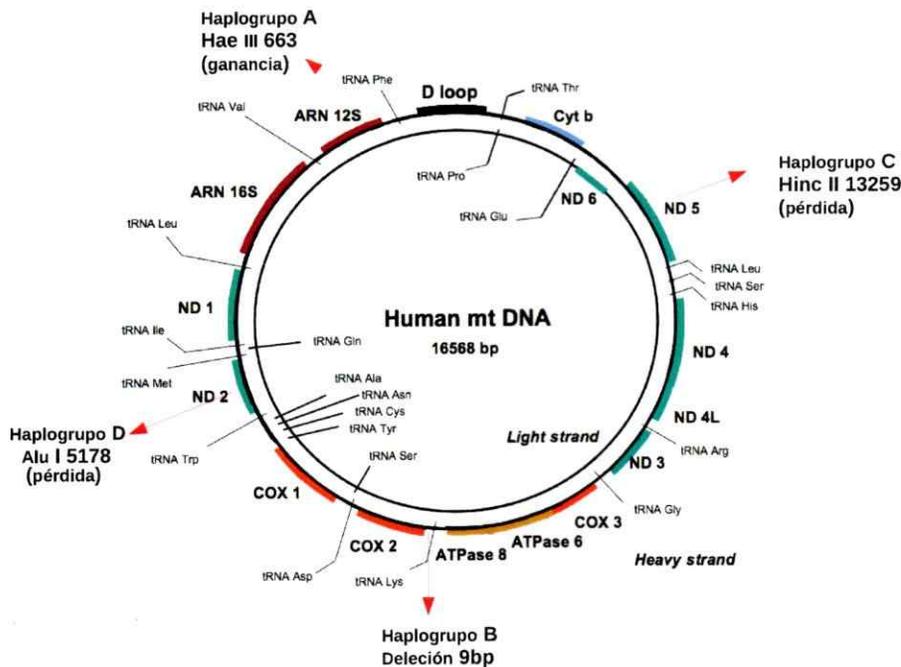


Figura 9: DNA mitocondrial y caracterización de haplogrupos mitocondriales amerindios.

La región control del DNA mitocondrial fue amplificada en fragmentos de entre 176 a 212 pares de bases, abarcando desde el sitio 16055 al 16382 para la HV1 y entre los sitios 57 y 330 para la HV2. En el caso de los individuos identificados como parte del haplogrupo D4h3, se amplificó y secuenció un fragmento extra para identificar la transición A16051G, característica del linaje D4h3a5. Los partidores utilizados son señalados en la tabla 3. Todos los fragmentos fueron secuenciados en ambas direcciones en Macrogen Inc. (Korea).

Análisis de Secuencias

La edición y alineamiento de las secuencias fueron realizados en el software Geneious v6.1.7 creado por Biomatters (www.geneious.com). En este mismo programa se identificaron las mutaciones asociadas a cada linaje según sus diferencias con la secuencia de referencia (rCRS, Andrews *et al*, 1999).

El análisis de las secuencias contempló evaluar la variabilidad intra e intergrupala, estimar el grado de diferenciación entre los grupos y la construcción de redes de haplotipos. Para fines comparativos, todos los análisis incluyeron 9 muestras de poblaciones nativas de Chile y Argentina, datos que fueron obtenidos de la literatura (Moraga *et al*, 2000; 2010; De Saint Pierre *et al*, 2012). Los estadísticos de diversidad genética básicos fueron estimados en el programa DnaSP 5.1 (Librado y Rozas, 2009) agrupando por etnia. Los estadísticos calculados fueron: número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (k), diversidad nucleotídica (π), número de haplotipos (h) y diversidad haplotípica (Hd). Además, la diferenciación entre grupos fue evaluada en el programa Arlequin v3.5 (Excoffier *et al*, 2005; Excoffier y Lischer, 2010) mediante el cálculo de F_{st} (10.000 permutaciones, significancia de 0.05) y un test exacto de diferenciación poblacional utilizando los parámetros por defecto (número de pasos de Cadena de Markov=100,000). Este último análisis es una extensión del test de Fisher, pero ampliado a tablas de contingencia de (número de poblaciones) por (número de haplotipos). Este análisis permite evaluar la diferenciación entre dos grupos al explorar todas las tablas de contingencia posibles y su probabilidad de ocurrencia respecto a los datos observados. Las filas de la tabla contienen a las poblaciones o muestras y los columnas a los haplotipos. La proporción de tablas con igual o menor valor de probabilidad que la tabla observada corresponde al valor de p (Raymond y Rousset, 1995). Se realizó también un análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa Arlequin v3.5 agrupando las muestras según áreas geográficas, evaluando la posible estructuración de las muestras. Con el objeto de explorar otras agrupaciones y comparar el resultado anterior, se realizó un análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) en el programa SAMOVA 1.0, el que permite identificar agrupaciones filogeográficamente homogéneas, maximizando la varianza debido a diferencias entre grupos de poblaciones (Dupanloup *et al*, 2002). Este análisis se ejecuto para un número k de agrupaciones de 2 a 10, siendo el k que maximiza el valor de F_{ct} considerado como el número más probable de agrupaciones (Dupanloup *et al*, 2002). Para las agrupaciones sugeridas por SAMOVA, se realizó un AMOVA en el programa Arlequin v3.5 con un total de 10,000 permutaciones.

Tabla 3: Partidores de DNA mitocondrial.

| Nombre | Ubicación | Tamaño de fragmento (bp) | Secuencia partidor (5'-3') |
|-------------------------------|-------------|--------------------------|----------------------------|
| A1 | 584-606 | | GTAGCTTACCTCCTCAAAGCAA |
| A2 | 709-729 | 145 | AGGGTGAACCTCACTGGAACG |
| B1 | 8195-8214 | | CACAGTTTCATGCCCATCGT |
| B2 | 8294-8316 | 113/122 | ATGCTAAGTTAGCTTTACAGTGG |
| C1 | 13236-13257 | | AATCGTAGCCTTCTCCACTTCA |
| C2 | 13345-13365 | 130 | GGAGCACATAAATAGTATGGC |
| D1 | 5099-5120 | | CCTAACTACTACCGCATTCTTA |
| D2 | 5190-5211 | 113 | GGGTGGATGGAATTAAGGGTGT |
| Region hipervariable 1 | | | |
| 16051F | 15966-15988 | | AGTCTTTAACTCCACCATTAGC |
| 16051R | 16095-16115 | 149 | GTGGCTGGCAGTAATGTACG |
| HV1-1F(1) | 16035-16054 | | GGAAGCAGATTTGGGTACCA |
| HV1-2R(4) | 16218-16237 | 203 | TGTGTGATAGTTGAGGGTTG |
| HV1-2F(3) | 16112-16131 | | CACCATGAATATTGTACGGT |
| HV1-3R(6) | 16302-16322 | 211 | TGGCTTTATGTACTATGTACT |
| HV1-3F(5) | 16190-16209 | | CCCCATGCTTACAAGCAAGT |
| HV1-4R(8) | 16383-16402 | 213 | TGGTCAAGGGACCCCTATCT |
| Region hipervariable 2 | | | |
| HV2-1F(9) | 34-56 | | GGGAGCTCTCCATGCATTTGGTA |
| HV2-2R(12) | 220-240 | 207 | TATTATTATGTCCTACAAGCA |
| HV2-2F(11) | 109-132 | | GCACCCTATGTCGCAGTATCTGTC |
| HV2-3R(14) | 266-285 | 177 | GTTATGATGTCTGTGTGGAA |
| HV2-3F(13) | 155-174 | | TAT TTATCGCACCTACGTTT |
| HV2-4R(16) | 331-353 | 200 | GTTTGGCAGAGATGTGTTTAAGT |

Finalmente se construyeron redes de haplogrupos para cada linaje por separado en el programa Network 4.6.1.2 utilizando el criterio de median joining (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>, Bandelt *et al*, 1999). Sitios homoplásicos, tales como 16189, 16311, 146 y 195, fueron penalizados con un peso menor en la matriz de polimorfismos con el objeto de evitar reticulaciones, según lo sugerido por De Saint Pierre *et al*, 2012.

Cromosoma Y

Considerando las dificultades inherentes al análisis de DNA antiguo, el análisis de cromosoma Y depende del estado de preservación del material genético en cada muestra. Se identificó el sexo de cada individuo utilizando el gen de Amelogenina, el que presenta una diferencia de 6 pares de bases entre los cromosomas X e Y. El análisis de cromosoma Y incluyó la identificación del linaje Q-M3 o Q1a2a1a1, caracterizado por el locus M3 (SNP rs3894) según lo descrito por Underhill y colaboradores (1996), además de haplogrupos europeos en los casos que corresponda. Adicionalmente, se evaluaron 4 STRs que han reportado variación en poblaciones nativas americanas (Bisso-Machado *et al*, 2012) y cuyo tamaño es posible de amplificar en muestras antiguas (no mayor a 200 bp). Los partidores son resumidos en la tabla 4. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl que incluyó: 3 µl del DNA extraído, 2 unidades de polimerasa Go Taq Hot Start (Promega), 2.5 µl de buffer 5x incluido con la enzima, 200 µM de cada dNTPs, 25 pmoles de cada partidor y 100 µg de BSA. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% y posteriormente secuenciados en ambas direcciones en Macrogen.Inc (Korea). Se evaluó la pertenencia a Q-M3 y el número de repeticiones utilizando el programa Geneious v6.1.7 creado por Biomatters (www.geneious.com).

Tabla 4: Partidores cromosoma Y (SNP, STRs)

| Marcador | Polimorfismo | Partidores (5'-3') | Tamaño fragmento | Referencia |
|----------------|------------------|---|------------------|-------------------------------|
| rs3894 Q-M3 | SNP: C - T | CCTGACAATGGGTCACCTCT CCAGATATTACATGGGACATGC | 126 | Este trabajo |
| DYS391 | STR: (TCTA)6-14 | TTCATCATACACCCATATCTGTC GATAGAGGGATAGGTAGGCAGGC | 89-121 | Gusmao <i>et al</i> , 2000 |
| DYS392 | STR: (TAT)6-17 | AAAAGCCAAGAAGGAAAAACAAA AAACCTACCAATCCCATTCTT | 93-125 | Ruitberg y Butler, 2000 |
| DYS393 | STR: (AGAT)10-17 | GTGGTCTTCTACTTGTGTCAATAC GAACTCAAGTCCAAAAAATGAGG | 108-140 | Myhre <i>et al</i> , 2000 |
| DYS439 | STR: (AGAT)9-14 | ACATAGGTGGAGACAGATAGATGAT GCCTGGCTTGGAATTCTTTT | 116-136 | Ruitberg y Butler, 2000 |

RESULTADOS

Del total de muestras procesadas, el 94.12% lograron ser tipificadas mediante PCR-RFLP y para el 85.3% se obtuvieron secuencias de la región hipervariable 1 y 2. Tanto en Kawéskar como en Yámana se identificaron sólo los haplogrupos C y D. En Kawéskar 15.4% fueron haplogrupo C y 84.6% haplogrupo D, mientras que en Yámana se observaron 89.47% C y 10.53% D. Estos resultados fueron consistentes con las réplicas realizadas en EEUU, excepto en aquellos casos en los que no se obtuvieron amplificadas. La asignación de haplogrupos a partir de las secuencias permitió identificar al haplogrupo C1, D1, D1g y D4h3a5 en la mayoría de los casos. El porcentaje de estos linajes en cada muestra se resumen en la figura 10 (sobre el total de muestras con secuencias). Los sitios informativos básicos de cada haplogrupo se identifican en relación a la secuencia de referencia (rCRS, Andrews *et al*, 1999) y corresponden a: en C1, los cambios 16223, 16298, 16325, 16327, 073, 249d, 263, 290-291d; en D1, los cambios 16223, 16325, 16362, 073 y 263; en D1g, se agrega a los anteriores el polimorfismo 16187; y en D4h3a5 los polimorfismos en 16051, 16223, 16241, 16342, 16362, 073 y 263 (Tamm *et al*, 2007; Perego *et al*, 2009; 2010).

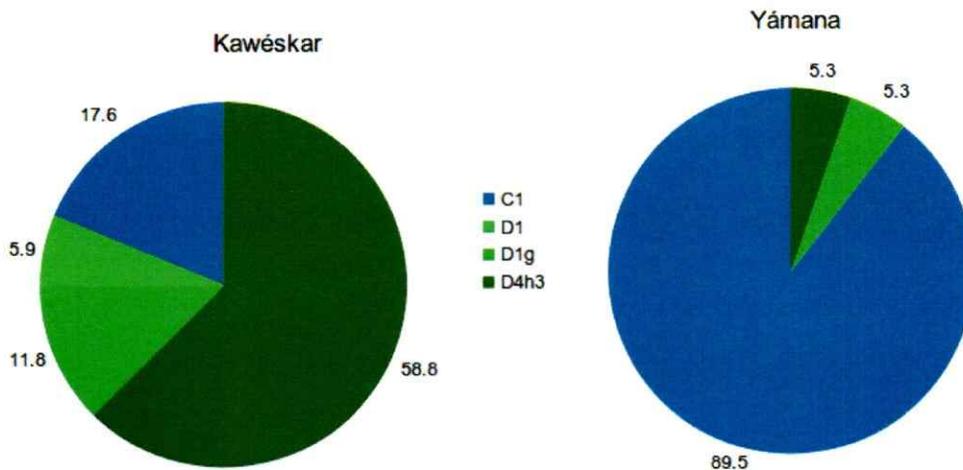


Figura 10: Distribución de linajes mitocondriales en muestras antiguas de Kawéskar y Yámana.

Destaca en esta distribución de haplogrupos el alto porcentaje de D4h3a5 en Kawéskar, alcanzando el 58.8%. Una distribución opuesta se observa en Yámana, donde cerca del 90% de los linajes caracterizados corresponden a C1.

A partir de las secuencias, se calcularon los índices de diversidad estándar en el programa DnaSP v5.1 (Librado y Rozas, 2009), los que se resumen en la tabla 5. Con fines comparativos, también se calcularon estos mismos índices en un conjunto de grupos nativos de Chile y Argentina (Moraga *et al*, 2000; 2010; De Saint Pierre *et al*, 2012).

Tabla 5: Índices de diversidad molecular en muestras nativas americanas de Chile y Argentina.

| Muestra | N | S | h | Hd | k | π | Referencia |
|--------------|----|----|----|-------|--------|---------|-------------------------------------|
| aKawéskar | 15 | 15 | 8 | 0.886 | 4.59 | 0.01039 | Este trabajo |
| aYámana | 17 | 17 | 10 | 0.838 | 3.824 | 0.0075 | Este trabajo |
| Aymara | 39 | 66 | 34 | 0.993 | 10.343 | 0.01048 | De Saint Pierre <i>et al</i> , 2012 |
| Atacamaño | 28 | 58 | 22 | 0.976 | 12.677 | 0.01284 | De Saint Pierre <i>et al</i> , 2012 |
| Pehuenche | 86 | 37 | 21 | 0.9 | 6.581 | 0.01075 | De Saint Pierre <i>et al</i> , 2012 |
| Huilliche | 57 | 60 | 31 | 0.968 | 11.311 | 0.01146 | De Saint Pierre <i>et al</i> , 2012 |
| MapucheChile | 19 | 41 | 16 | 0.982 | 9.977 | 0.01011 | De Saint Pierre <i>et al</i> , 2012 |
| MapucheArg. | 51 | 66 | 32 | 0.973 | 12.063 | 0.01222 | De Saint Pierre <i>et al</i> , 2012 |
| Tehuelche | 29 | 41 | 18 | 0.961 | 10.163 | 0.0103 | De Saint Pierre <i>et al</i> , 2012 |
| Kawéskar | 13 | 33 | 8 | 0.897 | 9.462 | 0.00959 | Moraga <i>et al</i> , 2010 |
| Yámana | 21 | 21 | 7 | 0.814 | 6.819 | 0.00691 | Moraga <i>et al</i> , 2000 |

N: número de individuos analizados; S: sitios polimórficos; h: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; k: número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias; π : diversidad nucleotídica.

Se evaluó la diferenciación entre las muestras en el programa Arlequin v3.5 a partir de las secuencias (Excoffier *et al*, 2005; Excoffier y Lischer, 2010). El test exacto de diferenciación poblacional indica que las muestras antiguas de Kawéskar (aKawéskar) y Yámana (aYámana) son significativamente distintas, con un p-valor de 0.00053 ± 0.0002 . Además, se realizó este análisis entre las muestras antiguas y modernas de la misma etnia (Kawéskar y Yámana) obteniendo como resultado que ambas muestras de Kawéskar no presentan diferencias significativas (p-valor de

0.05908 \pm 0.003), mientras que en Yámana se observan diferencias significativas con un p-valor de 0.01783 \pm 0.0026. La comparación de aKawéskar y aYámana con el resto de las poblaciones nativas muestra diferencias significativas con valores de p menores a 0.0015 (Tabla 2, Material Suplementario).

Se obtuvieron valores de Fst para cada par de poblaciones nativas, los que fueron graficados en la figura 11. El valor de Fst entre aKawéskar y aYámana fue significativo alcanzando un 0.12876 (p-valor <0.001). En el caso de Kawéskar, el valor de Fst entre las muestras actual y antigua fue de 0.05097 (p-valor de 0.08415 \pm 0.0027), mientras que en Yámana se obtuvo un 0.08076 (p-valor de 0.01960 \pm 0.0014). Los valores de Fst entre aKawéskar y otros grupos nativos varía entre 0.06168 (Aymara) y 0.10998 (Pehuenche), siendo todos significativos (p-valor < 0.05). En aYámana, el rango de valores obtenidos fue de 0.08637 (Aymara) y 0.13826 (Pehuenche), todos ellos significativos. A partir de la matriz de Fst (Tabla 3 Material suplementario) se realizó un dendrograma Neiborg-Joining en el software MEGA v6 (Tamura *et al*, 2013), señalado en la figura 12.

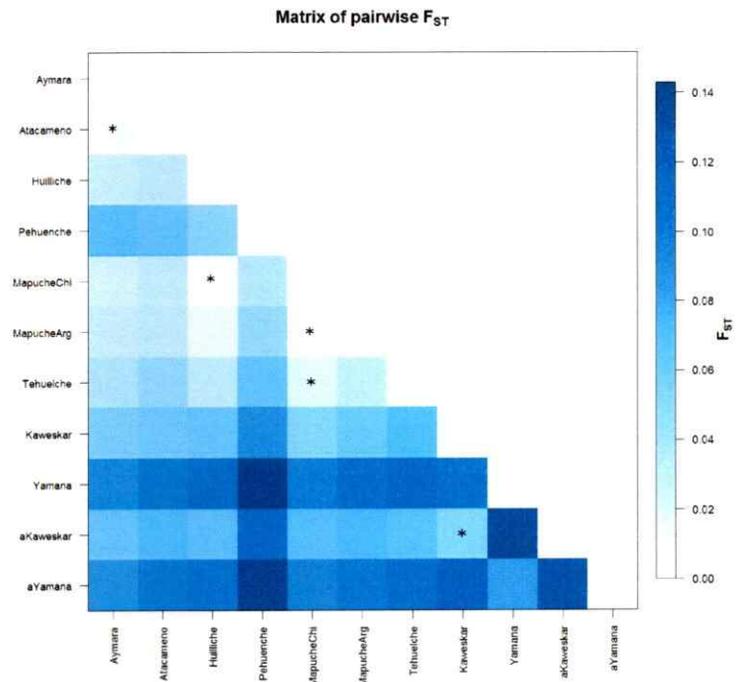
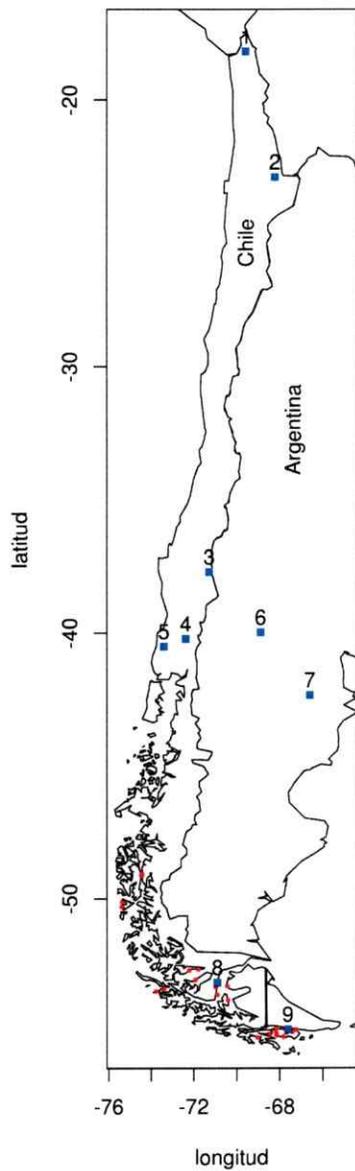


Figura 11: Matriz de F_{ST} . Se indica la ubicación geográfica de las muestras analizadas en conjunto con la matriz de F_{ST} obtenida en el programa Arlequin v 3.5 (se señala con * las muestras con valores de p no significativos). En el mapa, los cuadros azules muestran la ubicación de las poblaciones nativas modernas (1: Aymara; 2: Atacamaño; 3: Huilliche; 4: Pehuenche; 5: Mapuche Chile; 6: Mapuche Argentina; 7: Tehuelche; 8: Kawéskar; 9: Yámana), mientras que en puntos rojos se ubican las muestras antiguas obtenidas en este estudio.

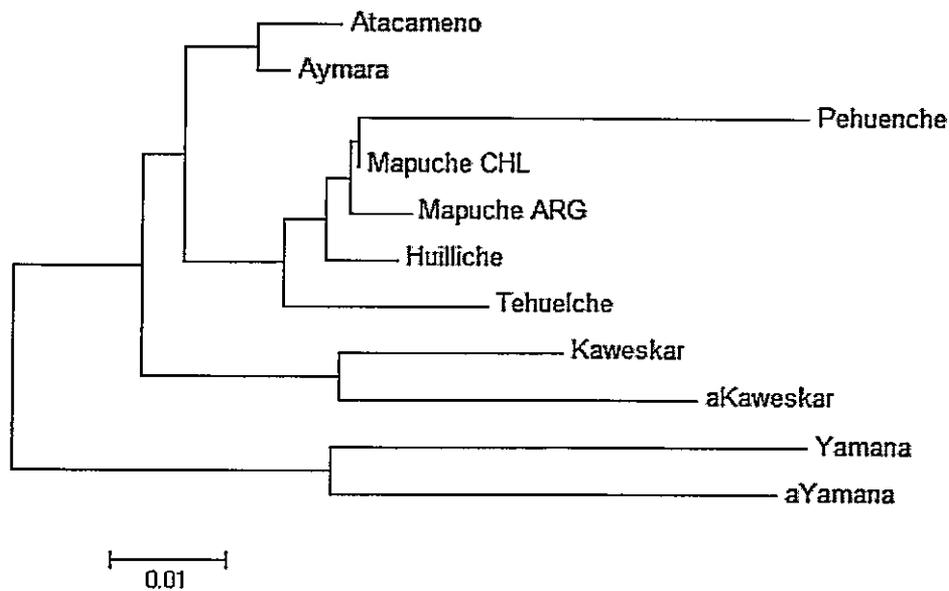


Figura 12: Dendrograma Neighbour-joining a partir de matriz Fst. La matriz de Fst fue calculada en el programa Arlequin v3.5 (Excoffier *et al*, 2005; Excoffier y Lischer, 2010) y exportada al programa MEGA v6 (Tamura *et al*, 2013) en donde se realizó el dendrograma. Las muestras antiguas de este estudio corresponden a aKawéskar y aYámana.

Para realizar el análisis de varianza molecular (AMOVA) las muestras fueron agrupadas en 3 grupos: norte, sur y extremo sur. El grupo norte incluyó a Aymara y Atacameño; el grupo sur a Pehuenche, Huilliche, Mapuche-Chile, Mapuche-Argentina y Tehuelche; y el grupo de extremo sur a Kawéskar, Yámana, aKawéskar y aYámana. Los resultados de este análisis indican un Fct de 0.02643 (p-valor de 0.00188 ± 0.00041), con la mayor parte de la variación explicada por diferencias dentro de las muestras (93.08%). Los resultados de SAMOVA indican que el mayor valor de Fct corresponde a un k de 8 (Fct= 0.05374, p-valor < 0.001), siendo la mayor parte de la varianza explicada por las diferencias intra-muestra (93.59%). Los grupos sugeridos son: 1) Aymara-Atacamaño, 2) Pehuenche, 3) Huilliche-MapucheChi-MapucheArg, 4) Tehuelche, 5) Kawéskar, 6) Yámana, 7) aKawéskar, 8) aYámana. Todos los resultados de AMOVA y SAMOVA se indican en la tabla 6 según las distintas agrupaciones.

Tabla 6: Resultados AMOVA.

| Agrupaciones | | Porcentaje de variación | Índice de fijación | | Valor p (índices) |
|---|------------------------------|-------------------------|--------------------|---------|-------------------|
| Geográfica: (1-2);(3-7);(8-11) | Entre grupos | 2.64 | Fct | 0.02643 | 0.00188±0.00041 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 4.28 | Fsc | 0.04392 | >0.0001 |
| | Intra poblaciones | 93.08 | Fst | 0.06919 | >0.0001 |
| K=2 (10);(1-9, 11) | Entre grupos | 2.67 | Fct | 0.02675 | 0.26792±0.00442 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 5.57 | Fsc | 0.05718 | >0.0001 |
| | Intra poblaciones | 91.76 | Fst | 0.0824 | >0.0001 |
| K=3 (1-9);(10);(11) | Entre grupos | 4.56 | Fct | 0.04562 | 0.05297±0.00236 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 4.91 | Fsc | 0.05146 | >0.0001 |
| | Intra poblaciones | 90.53 | Fst | 0.09473 | >0.0001 |
| K=4 (1-2);(3-7,9);(8,10); (11) | Entre grupos | 2.38 | Fct | 0.02381 | 0.02535±0.00163 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 4.58 | Fsc | 0.04689 | >0.0001 |
| | Intra poblaciones | 93.04 | Fst | 0.06958 | >0.0001 |
| K=5 (1-2);(3-7,9);(8); (10);(11) | Entre grupos | 2.36 | Fct | 0.02359 | 0.05426±0.00249 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 4.58 | Fsc | 0.04695 | >0.0001 |
| | Intra poblaciones | 93.39 | Fst | 0.06943 | >0.0001 |
| K=6 (1);(2);(3-7,9);(8); (10);(11) | Entre grupos | 1.3 | Fct | 0.01297 | 0.24406±0.00402 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 6.16 | Fsc | 0.05224 | >0.0001 |
| | Intra poblaciones | 93.55 | Fst | 0.06453 | >0.0001 |
| K=7 (1-2);(3-6);(7);(8); (9);(10);(11) | Entre grupos | 4.06 | Fct | 0.04061 | 0.00277±0.00051 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 2.92 | Fsc | 0.03042 | >0.0001 |
| | Intra poblaciones | 93.02 | Fst | 0.06979 | >0.0001 |
| K=8 (1-2);(3);(4-6);(7); (8);(9);(10);(11) | Entre grupos | 5.37 | Fct | 0.05374 | 0.0001±0.00014 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 1.04 | Fsc | 0.01096 | 0.01188±0.00108 |
| | Intra poblaciones | 93.59 | Fst | 0.06411 | >0.0001 |
| K=9 (1);(2);(3-5);(4-6); (7);(8);(9);(10);(11) | Entre grupos | 4.14 | Fct | 0.04144 | 0.01337±0.00121 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 2.05 | Fsc | 0.02142 | 0.00248±0.0005 |
| | Intra poblaciones | 93.8 | Fst | 0.06197 | >0.0001 |
| K=10 (1-2);(3);(4);(5);(6); (7);(8);(9);(10);(11) | Entre grupos | 4.84 | Fct | 0.04841 | 0.05713±0.00222 |
| | Entre poblaciones intragrupo | 1.15 | Fsc | 0.01203 | 0.0695±0.00234 |
| | Intra poblaciones | 94.01 | Fst | 0.05986 | >0.0001 |

1: Aymara; 2: Atacameño; 3: Pehuenche; 4: Huilliche; 5: MapucheChile; 6: MapucheArgentina; 7: Tehuelche; 8: Kawéskar; 9: Yámana; 10: aKawéskar; 11: aYámana.

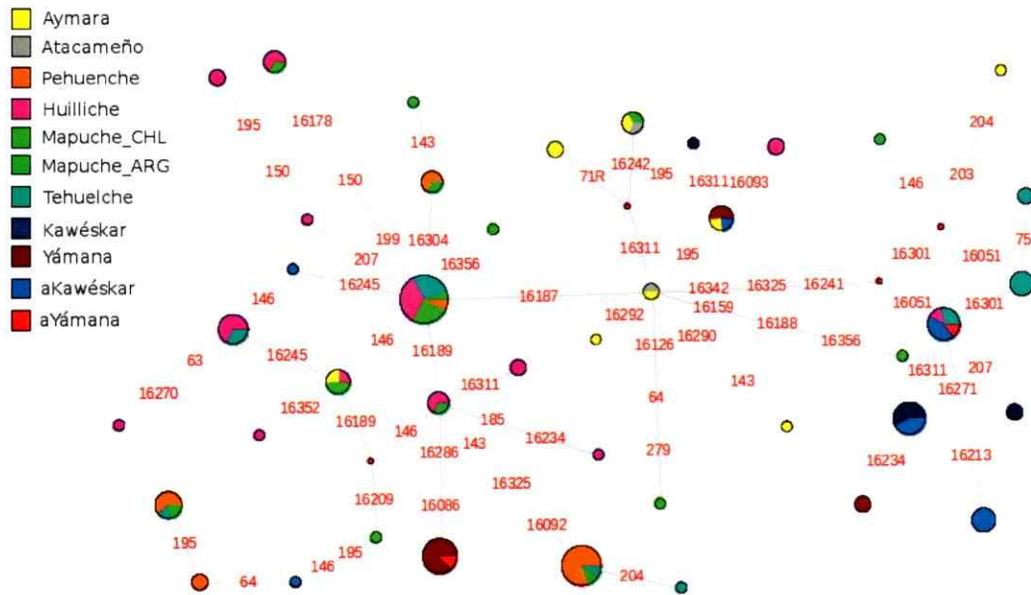


Figura 14: Network haplogrupo D. El haplogrupo se definió en base a las mutaciones 16223, 16325, 16362, 073 y 263 en relación a la secuencia de referencia (rCRS, Andrews *et al*, 1999). Sólo se consideraron las mutaciones de los fragmentos de HV1 y HV2 según las lecturas obtenidas en secuencias antiguas (HV1: 16051-16382; HV2: 57-330). El network fue realizado en el programa Network v4.612 utilizando el criterio de median joining.

Cromosoma Y

La identificación de sexo mediante amplificación del gen Amelogenina fue posible en 11 individuos aKawéskar (78.5%) y 18 en aYámana (90%). En el primer grupo, 5 individuos fueron identificados como femeninos y 6 masculinos, mientras que en Yámana, 10 individuos fueron femeninos y 8 masculinos. Para la mayoría de las muestras se cuenta con la estimación de sexo en base a información morfológica, la que fue concordante, excepto en dos casos en Kawéskar y uno en Yámana, con los datos moleculares. Del total de individuos identificados como masculinos (14) el locus r3894 (C/T) fue posible de analizar en 5 muestras Kawéskar y 4 Yámana. Todos estos individuos presentan el polimorfismo propio del haplogrupo Q-M3 (C→T), característico de nativos americanos (Underhill *et al*, 1996; Karafet *et al*, 2008). Se analizaron cuatro

STRs que han mostrado variabilidad en poblaciones nativas americanas (Bisso-Machado *et al*, 20). Pese a que se obtuvieron amplificados para la mayoría de los individuos (8) en los 4 STRs, para un STR no fue posible obtener secuencias (DYS439). Los resultados de los otros STRs se muestran en la tabla 7 por individuo. Solo DYS392 presentó diferencias entre los individuos, obteniendo 14 y 16 repeticiones. El bajo número de la muestra analizada y la escasa variación entre los individuos no permite un análisis más extendido de estos datos, aunque enfatizan la baja variabilidad previamente observada con mtDNA.

Tabla 7: Resultados STR en cromosoma Y.

| Individuo | Muestra | DYS391 | DYS392 | DYS393 |
|-----------|----------|--------|--------|--------|
| IPK05 | Kawéskar | 10 | 16 | 13 |
| IPK08 | Kawéskar | 10 | 16 | 13 |
| IPK09 | Kawéskar | 10 | 14 | 13 |
| IPK10 | Kawéskar | NA | NA | 13 |
| IPK13 | Kawéskar | 10 | 16 | 13 |
| IPY04 | Yámana | 10 | 14 | 13 |
| IPY10 | Yámana | 10 | 16 | 13 |
| MG30a | Yámana | 10 | 16 | 13 |

NA: No amplifica.

Avances en secuenciación genómica

En el curso de esta tesis, se realizó una pasantía en el centro de Geogenética, Universidad de Copenhagen (Dinamarca) bajo la tutela de la Dra. Paula Campos y Dr. Eske Willerslev, y gracias al financiamiento otorgado por Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Departamento de Posgrado y Postítulo. Durante esta estadía se aprendieron diversas técnicas para la preparación de librerías genómicas en aDNA, aplicando éstas técnicas en 6 muestras de las mismas etnias analizadas en esta tesis (detalle en Tabla 1 de Material Suplementario). La evaluación preliminar de estas librerías ha permitido obtener información genómica de 5 individuos (3 Kawéskar y 2 Yámana), para los cuales se evaluó el porcentaje de DNA endógeno, estimado a partir del porcentaje de reads que mapean en el genoma humano de referencia, el que

fluctúa entre 70% y 1.6%. En las librerías con menor porcentaje endógeno se realizó una captura positiva de genoma completo, obteniendo un incremento de 4 hasta 10 veces. Un total de cuatro muestras, dos de cada etnia, serán secuenciadas en plataforma Illumina procurando una profundidad de 5x por individuo. La secuenciación de estos individuos será posible a través del proyecto CONICYT-NSF "Genomic investigation of the human biodiversity in the pre-Columbian and contemporary Chilean Patagonia" dirigido por el Dr. Ricardo Verdugo.

DISCUSIÓN

En términos generales, los resultados dan cuenta de la buena preservación del DNA en las muestras, permitiendo el análisis de aproximadamente el 90% de ellas. Además, la consistencia entre réplicas a nivel de haplogrupos mitocondriales permite dar cuenta de la autenticidad de los resultados. Como es habitual en estudios de DNA antiguo, se observa una importante diferencia entre los resultados de mtDNA y cromosoma-Y, siendo posible caracterizar los linajes mitocondriales en 94% de las muestras, mientras que un 64% de los individuos masculinos fueron caracterizados para cromosoma-Y. Este resultado enfatiza las ventajas de trabajar con DNA mitocondrial en restos antiguos por sobre otros marcadores, dada la mayor probabilidad de obtener resultados positivos en la implementación de análisis moleculares tradicionales. Tanto los linajes encontrados en DNA mitocondrial como en cromosoma Y son consistentes con lo esperado en poblaciones nativas americanas, sin encontrar en este último marcador evidencias de linajes europeos. Contrario a lo que podría esperarse de grupos tardíos, potencialmente mestizados con población europea, los individuos masculinos que pudieron ser caracterizados presentaron sólo el linaje Q-M3 (o Q1a2a1a1). La probabilidad de encontrar linajes europeos era mayor en cromosoma Y dado el mestizaje desigual descrito en América, ocurrido principalmente entre población nativa femenina y población europea masculina (revisado en Salzano y Sans, 2014).

La identificación sólo de linajes mitocondriales C y D en ambos grupos confirma lo observado en otros trabajos, en donde se sugiere una disminución importante de la diversidad en las poblaciones del extremo sur de Sudamérica principalmente en grupos cazadores recolectores canoeros, aunque individuos Selk'nam y Tehuelches antiguos también muestran esta tendencia (Lalueza *et al*, 1997; García-Bour *et al*, 2004; Moraga *et al*, 2000; 2010). En la figura 15 se muestra un gráfico con los porcentajes de C y D relevados en otros trabajos, en donde se enfatiza no sólo la ausencia de linajes A y B en Kawéskar y Yámana (a excepción de un individuo Kawéskar actual), sino también la diferencia en las frecuencias de C y D entre ambas etnias. La consistencia de estos datos sugiere fuertemente que los resultados obtenidos no son el resultado de un sesgo en el muestreo, sino mas bien una característica propia de los grupos analizados.

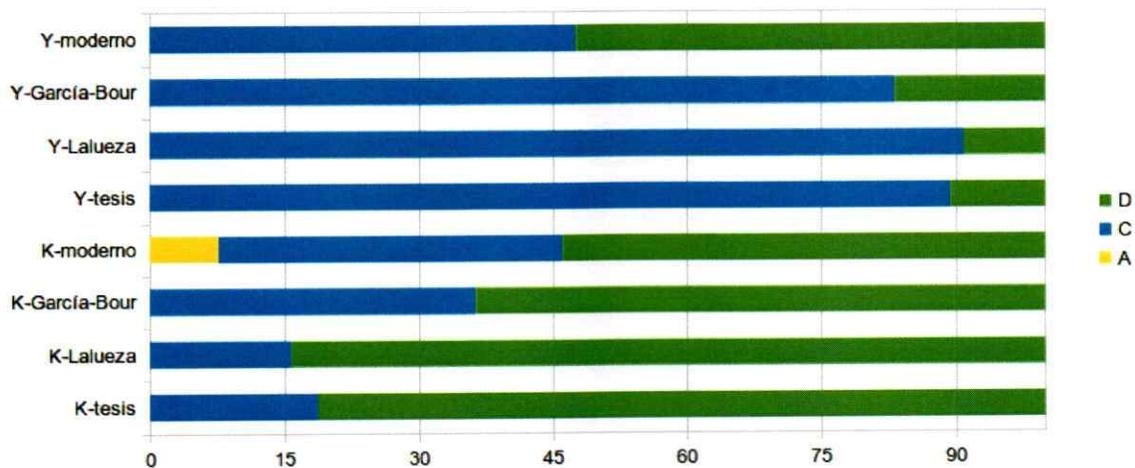


Figura 15: Porcentaje de haplogrupos en distintas muestras de Kawéskar (K) y Yámana (Y). En el trabajo realizado por Lalueva y colaboradores (1997) sólo se cuenta con la caracterización de macro-haplogrupos (C y D) en un total de 30 individuos, mientras que en García-Bour *et al* (2004) se presentan los resultados sólo para la región hipervariable 1 (16156-16362) en 17 individuos. Los datos de Kawéskar y Yámana moderno fueron obtenidos en Moraga *et al*, 2000 y 2010.

En el caso de las muestras actual y antiguas de Kawéskar se observa consistentemente una mayor proporción de linajes D de Kawéskar, situación de que ocurre en Yámana con el linaje C. Esta situación se refleja también en los resultados del test de diferenciación poblacional que indican diferencias significativas entre Yámana actual y aYámana.

La disminución de diversidad genética inferida a partir de linajes mitocondriales ha sido atribuida mayoritariamente al cuello de botella inicial durante el poblamiento del área (Lalueva *et al*, 1997; Raff *et al*, 2011). Sin embargo, individuos tempranos (pre-4500 AP) o cazadores recolectores terrestres continentales han sido previamente identificados como B, aunque en baja frecuencia (Moraga *et al*, 2010). En este sentido, la disminución de diversidad en los grupos cazadores recolectores canoeros podría estar asociada a eventos de deriva en tiempos posteriores al poblamiento inicial, asociados al modo de vida o tamaños poblacionales de estos grupos. Aun cuando no se cuenta con cálculos precisos del tamaño de estas poblaciones previo al contacto o en

tiempos inmediatamente posteriores, en general se han estimado tamaños poblacionales bajos considerando la extensión de territorio y asociados a dos líneas de evidencia: modo de subsistencia y avistamientos por parte de navegantes europeos. Los modos de subsistencia condicionan en gran medida la organización espacial de las poblaciones, particularmente en grupos cazadores recolectores (Borrero y Barberena, 2006). La continua búsqueda de recursos y estacionalidad de algunos de ellos requiere de una extensión de territorio de explotación mayor que el esperable en grupos sedentarios o semi-sedentarios, sugiriendo entonces tamaños poblacionales relativamente pequeños en relación al área geográfica (Gusinde, 1986 [1937], 1951; Borrero, 2001). Considerando ambas líneas de evidencia, se estimó un número de individuos no superior a 5,000 para Kawéskar y 3,000 para Yámana en los inicios del contacto europeo, mientras que hacia mediados del siglo XX se registraban cerca de 250 y 50 individuos respectivamente (Gusinde, 1986 [1937], 1991 [1974]; Martinic, 1989). Las consecuencias de esta importante y rápida disminución de las poblaciones mayoritariamente atribuido al contacto con poblaciones europeas, podría estar reflejado en los resultados de este trabajo, considerando que para gran parte de las muestras analizadas se ha inferido una data histórica. Sólo se cuenta con fechados en 6 individuos, cuyo rango es de 250 ± 30 AP a 2000 AP.

A nivel de secuencias, los índices de diversidad molecular estándar también reflejan una baja diversidad obteniendo valores menores en aKawéskar y aYámana en relación a otras etnias a lo largo de Chile. En el caso de diversidad haplotípica, se observaron valores de 0.886 y 0.838 en aKawéskar y aYámana respectivamente. Por su parte, las muestras actuales de Kawéskar y Yámana presentan valores de diversidad haplotípica de 0.897 y 0.814 respectivamente, mientras que el rango en las otras poblaciones nativas varía de 0.9 (Pehuenche) a 0.993 (Aymara). Lo mismo ocurre con el promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (k), en donde aKawéskar presenta un valor de 4.59 y aYámana de 3.824. En las muestras actuales, Kawéskar y Yámana presentan valores de 9.462 y 6.819, mientras que el rango obtenido en las otras poblaciones es de 6.581 (Pehuenche) y 12.677 (Atacameño).

Pese a la identificación de sólo dos haplogrupos mitocondriales en las muestras analizadas, se obtuvieron diferencias significativas entre aKawéskar y aYámana (test exacto de diferenciación poblacional, p -valor < 0.001), las que pueden ser explicadas por el evidente sesgo en la frecuencia de estos haplogrupos, alcanzando D una

frecuencia cercana al 85% en Kawéskar, mientras que en Yámana se observa una frecuencia de C cercana al 90%. Además, el valor de Fst entre estas dos muestras fue de 0.12876 (p-valor > 0.001), dando cuenta de una moderada diferenciación entre ambas muestras y siendo uno de los valores de Fst más altos en la matriz, junto con aKawéskar-Yamana actual (0.13517, p-valor = 0.00109 ± 0.0004) y aYamana-Kawéskar actual (0.11677, p-valor = 0.00198 ± 0.0004). En comparación con otros grupos nativos, las muestras analizadas presentan diferencias significativas (test exacto de diferenciación poblacional, p-valores menores a 0.01), a excepción de aKawéskar y Kawéskar actual, entre quienes además se observa un bajo valor de Fst (0.05097), aunque este valor es no significativo. Por el contrario, las muestras de aYamana y Yámana actual presentan diferencias significativas (p-valor = 0.01783 ± 0.0026) y un valor de Fst de 0.08086 (p = 0.0196 ± 0.0014).

Considerando las distancias geográficas entre muestras, la matriz de Fst obtenida no se ajusta exactamente a lo esperado, en donde las muestras del norte debiesen presentar una mayor diferenciación genética respecto a las muestras del sur, observándose un gradiente latitudinal. Este fenómeno podría explicarse principalmente por el tipo de datos analizados (secuencias), considerando que la presencia de sitios homoplásicos en todos los haplogrupos subestima su diferenciación, mientras que sitios que definen ciertos sub-haplogrupos dentro de un mismo linaje podrían sobreestimar la diferenciación entre muestras (D1g y D4h3 por ejemplo). Considerando esta situación, se generó una nueva matriz de Fst, esta vez a partir de las frecuencias de 8 haplogrupos: A2, B2, B2i2, C1, C1b13, D1, D1g y D4h3. La asignación a cada haplogrupo se realizó considerando las mutaciones características en comparación a la referencia rCRS (Andrews *et al*, 1999). Estas 8 categorías representan el mayor nivel de resolución que se puede alcanzar considerando los rangos de lectura en las muestras antiguas. El resultado de esta matriz se grafica en la figura 16 y los valores son señalados en la tabla 4 de Material Suplementario. En este caso, los valores obtenidos se ajustan mejor al gradiente de diferenciación esperado en relación a las distancias geográficas, aunque se advierte una sobreestimación de la diferenciación entre muestras, obteniendo valores de Fst muy altos cercanos a 0.5. Pese a ello, y en relación a las muestras antiguas de Kawéskar y Yámana, los resultados son concordantes con lo observado anteriormente.



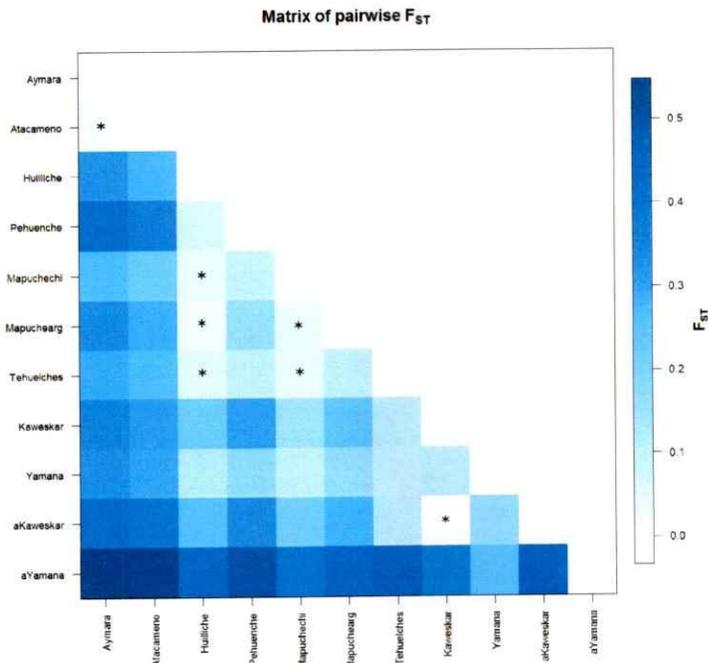


Figura 16: Matriz de F_{ST} obtenida a partir de frecuencias. En * se indican los valores de F_{ST} no significativos.

En relación a cromosoma Y, los 9 individuos analizados son parte del mismo haplogrupo Q-M3 (Q1a2a1a1) y sólo se observaron diferencias en un STR (DYS392(14) y (16)), cuya variación no está asociada a uno u otro grupo. Trabajos anteriores en aDNA de grupos extintos de Patagonia y Tierra del Fuego sólo permiten comparar *DYS393*, el que presenta *DYS393(13)* en dos individuos Tehuelches (García-Bour *et al*, 2004). Una revisión de marcadores uniparentales en 29 grupos indígenas de Sudamérica, señala una frecuencia de *DYS391(10)* cercana al 80% (N=512), *DYS392(14)* de 51%, *DYS392(16)* de 10% (N=535) y *DYS393(13)* de 67% (N=584). Aun cuando el cono sur de Sudamérica está escasamente representado en esta revisión (Bisso-Machado *et al*, 2012), se observa que los individuos analizados en este trabajo presentan las variantes más frecuentes en Sudamérica, a excepción de *DYS392(16)* que fue identificado en 5 de las 7 muestras.

A nivel de sub-haplogrupos mitocondriales, no se observan diferencias importantes entre ambas etnias, más allá del sesgo ya descrito. En el caso de Kawéskar llama particularmente la atención la alta frecuencia del linaje D4h3a5, incluyendo una variante no descrita en la literatura e identificada en 4 individuos, caracterizada por las transiciones G16213A y T16271C. Dos individuos con esta variante provienen del mismo sitio y corresponden a sub-adultos de aproximadamente 7 años de edad, uno masculino y otro femenino (número 4 en Figura 8), mientras que los otros dos individuos (masculino y femenino) provienen de distintos sitios próximos a Puerto Edén (números 1 y 3 en Figura 8). Los dos individuos masculinos con este linaje, presentan las mismas variantes de STR caracterizada por DYS391(10)-DYS392(16)-DYS393(13). La representación de este linaje D4h3a5+16213A+16271C sólo en individuos de distribución norte resulta interesante en relación a lo descrito etnográficamente sobre la estructuración de la etnia en 3 grupos principales: meridional, central y septentrional. La separación de estos grupos es básicamente geográfica, dada la presencia de canales principales de difícil navegación, y que se describió en relación a particularidades dialectales entre ellos (Gusinde, 1991 [1974];).

La muestra de Kawéskar actual también presenta una alta frecuencia del linaje D4h3a5, el que alcanza un 46.2%. El segundo grupo nativo que presenta una alta frecuencia de este linaje es Tehuelche, con un 27.6%. Sin embargo, tal como se observa en el network (Figura 14), los individuos Tehuelches se caracterizan por la mutación C16301T, ausente en ambas muestras de Kawéskar. En este último grupo, se observa en 6 individuos actuales y dos antiguos la transición T16311C, además de la variante ya mencionada (D4h3a5+16213+16271). La presencia de D4h3a5 en alta frecuencia también ha sido observada en Chono, etnia canoera distribuida desde el sur de Chiloé al Golfo de Penas y extinta desde el siglo XVIII, cuya frecuencia alcanza casi un 30% (Moraga com.pers). En un contexto continental, el linaje está presente a lo largo de todo el continente, aunque en frecuencias cercanas al 1.5% (Kemp *et al*, 2007; Cui *et al*, 2013). Su temprana presencia en sitios de Norteamérica (OYKC, Alaska, fechado en ~10,300 AP y un sitio en la costa norte de British Columbia, Canadá, fechado en ~6,000 AP) junto a su ausencia en Asia a excepción de un individuo, han permitido postular que corresponde a un linaje fundador en América, asociado probablemente a una ruta costera rápida. Esto último es inferido a partir de la presencia del linaje a lo largo de toda América, generalmente en proximidad a la costa

Pacífica, sumado a su aumento de frecuencia en el cono sur (Tamm *et al*, 2007; Perego *et al*, 2009). Otra variante del haplogrupo D que cabe destacar es D1g, el que presenta una distribución geográfica restringida al sur de Sudamérica, siendo posiblemente un linaje fundador en esta zona (Bodner *et al*, 2012). En el caso particular de aKawéskar, un sólo individuo presenta esta variante, en conjunto con las sustituciones T195C, C16189T y T16209C. Esta variante también está presente en individuos nativos actuales del centro-sur como se observa en la figura 14 (Network D), aunque en baja frecuencia. Sin embargo, la variante resulta particularmente interesante en relación a otro contexto antiguo de Patagonia localizado en el Lago Salitroso, región posteriormente asociada a la etnia Tehuelche (Provincia de Santa Cruz, Argentina). El sitio presenta entierros en chenques fechados entre 1200 y 300 Cal. AP y en nichos o bajo bloque fechados entre 2750 y 2250 Cal. AP (Tessone *et al*, 2005). De un total de 15 muestras para las cuales se obtuvieron secuencias de mtDNA, 5 individuos, provenientes de ambos tipos de entierros, presentan la variante D1g+T195C+C16189T+T16209C (M. Moraga, com. pers.). Por su parte, sólo a partir de un fragmento de HV1, 2 individuos Tehuelches, 1 Kawéskar y 1 Yámana analizados en García-Bour y colaboradores (2004), podrían asociarse a este sub-linaje. La profundidad temporal de esta variante y los límites de su distribución geográfica no son posibles de precisar en este trabajo, aunque se sugiere una concentración en el área de Patagonia.

En los individuos Yámana, se observaron diferencias significativas entre las muestras modernas y antiguas, presentando Yámana actual una mayor frecuencia de D. Sin embargo, a nivel de sub-haplogrupos se observa en los networks (Figura 13 y 14) que ambas muestras comparten linajes similares. En el caso de C, aYámana es parte del haplogrupo central o derivados de este, junto con Yámana actual, como es el caso de los individuos que comparten las variantes 16291-195. En el caso del haplogrupo D, de los dos individuos aYámana identificados, uno es D4h3a5 y el otro D1g. Este último presenta las variaciones 16189-16286-16086 observadas sólo en Yámana actual. Esta situación sugiere cierto nivel de continuidad entre ambas muestras, pese a que a nivel global presentan diferencias significativas.

La matriz de Fst también fue utilizada para construir un dendrograma Neighbor-joining, en donde se puede observar la agrupación de las muestras del norte (Aymara-Atacameño) *versus* las del sur (Huilliche-Pehuenche-MapucheChi-MapucheArg-Tehuelche), mientras que las muestras pertenecientes a Kawéskar (actual y antiguo) y

Yámana (actual y antiguo) se encuentran separadas y no conforman un sólo cluster como podría esperarse según su proximidad geográfica. Junto con ello, el test de AMOVA realizado tanto con las agrupaciones geográficas *a priori* como a partir de los resultados de SAMOVA, sugieren un bajo nivel de estructuración de las muestras principalmente en el extremo sur, siendo sobre el 90% de la variación explicada por diferencias intra-muestras. En particular, el análisis de SAMOVA sugiere que el mayor valor de Fct se obtiene con un número de grupos igual a 8, donde las 4 muestras de Patagonia (actuales y antiguas) se encuentran separadas, resultado que es concordante con la diferenciación entre ambos grupos. Un segundo dendrograma Neighbor-joining se realizó con la matriz de Fst obtenida a partir de frecuencias, según lo discutido anteriormente (figura 17). En este dendrograma se mantienen las mismas agrupaciones sugeridas anteriormente, aunque se refleja la mayor distancia entre las muestras del norte (Aymara y Atacameño) con las del sur y extremo sur. A su vez, se acentúa la diferenciación de la muestra de Yámana antiguo.

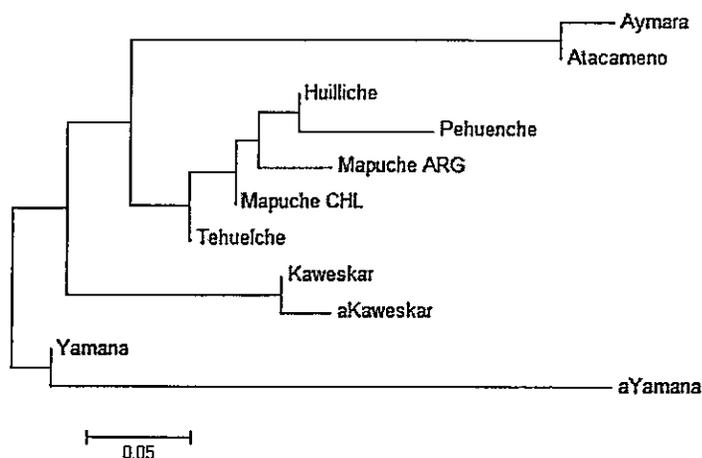


Figura 17: Dendrograma Neighbor-joining a partir de matriz de Fst. La matriz de Fst fue calculada en el programa Arlequin v3.5 (Excoffier *et al*, 2005; Excoffier y Lischer, 2010) a partir de las frecuencias de haplogrupos. Esta matriz fue exportada al programa MEGA v6 (Tamura *et al*, 2013) en donde se realizó el dendrograma.

Los resultados de este trabajo sugieren una diferenciación importante de ambos grupos, en concordancia con lo descrito etnográficamente para estas etnias. En

términos de su cultura material, presentan elementos comunes relacionados a sus modos de subsistencia (cazadores recolectores marinos), mientras que en términos lingüísticos se reconoce que ambos lenguajes tienen un origen común, pero que no eran mutuamente comprensibles. La divergencia de estos lenguajes, así como la presencia de dialectos al interior de cada etnia, han sido asociadas a variables geográficas que limitaron el contacto entre grupos (Gusinde, 1986 [1937], 1991 [1974]; Barceló *et al*, 2011), situación que también podría explicar la diferenciación genética inferida a partir de linajes mitocondriales.

CONCLUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo era contribuir a la historia local de Patagonia y Tierra del Fuego a partir del estudio de linajes uniparentales en restos óseos antiguos asociados a dos etnias cazadores recolectoras canoeras, Kawéskar y Yámana. En los resultados obtenidos destaca en primera instancia el alto porcentaje de muestras para las cuales se obtuvieron datos de mtDNA y cromosoma Y, dando cuenta de las buenas condiciones de preservación del DNA en el área geográfica.

Consistente con lo esperado para grupos nativos americanos del extremo sur y en concordancia con otros estudios del área, solo fueron encontrados linajes C y D en las muestras estudiadas. Respecto a cromosoma-Y, aun cuando un reducido número de muestras logró ser analizado, no se identificaron eventos de mestizaje, siendo todos los individuos parte del linaje nativo americano Q1a2a1a1 o Q-M3.

Respecto a los linajes maternos, los análisis sugieren una importante diferenciación entre los grupos Kawéskar y Yámana, principalmente en base a la proporción de linajes mitocondriales D y C. Mientras Kawéskar presenta una alta frecuencia del haplogrupo D (84,6%), particularmente D4h3a5, el haplogrupo C1 en Yámana alcanza una frecuencia cercana al 90%. En cromosoma-Y, los resultados de este marcador no fueron lo suficientemente informativos en términos de variabilidad entre los grupos, siendo necesario explorar nuevas variantes dentro de estos linajes. Sin embargo, se sugiere una baja variabilidad en los linajes paternos en la zona. En relación a la hipótesis planteada en este trabajo, es posible reconocer diferencias significativas entre ambos grupos a partir de los linajes uniparentales maternos, situación que es consistente con la diferenciación lingüística y geográfica de las etnias descrita en la literatura.

En comparación con grupos nativos actuales del extremo sur y otras áreas de Chile y Argentina, se observa cierto nivel de continuidad dentro de los grupos Kawéskar y Yámana, en base a la presencia de haplogrupos exclusivos compartidos dentro de cada etnia. En el caso específico de Kawéskar, las diferencias entre la muestra actual y antigua fueron no significativas, mientras que en Yámana fueron significativas, pero ambas muestras comparten sub-linajes mitocondriales.

BIBLIOGRAFÍA

- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, et al. 2008. The phylogeny of the four pan-American mtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS ONE* 3: e1764.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature genetics* 23(2): 147.
- Bailliet G, Rothhammer F, Carnese FR, Bravi CM, Bianchi NO. 1994. Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *Am J Hum Genet* 55:27-33.
- Bailliet G, Ramallo V, Muzzio M, García A, Santos MR, Alfaro EL, Dipierri JE, Salceda S, Carnese FR, et al. 2009. Brief communication: Restricted geographic distribution for Y-Q* paragroup in South America. *American journal of physical anthropology* 140:578-82.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- Balter M. 2011. Tracing the Paths of the First Americans . *Science* 333: 1692.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16(1): 37-48.
- Barceló JA, Florencia M, Moreno E, Videla B. 2009. Where Does the South Begin ? Social Variability at the Southern Top of the World. *Artic Anthropology* 46:50-71.
- Barceló JA, del Castillo Bernal F, Mameli L, Moreno E, Saez A. 2011. Patagonia: Del Presente Etnográfico al Pasado Arqueológico. *Arqueología Iberoamericana* 9: 5-39 .
- Battaglia V, Grugni V, Perego UA, Angerhofer N, Gomez-Palmieri JE, et al. 2013. The First Peopling of South America: New Evidence from Y- Chromosome Haplogroup Q. *PLoS ONE* 8(8): e71390.
- Bisso-Machado R, Bortolini MC, Salzano FM. 2012. Uniparental genetic markers in South Amerindians . *Genetics and Molecular Biology*, 35(2): 365-387.
- Briggs AW, Stenzel U, Johnson P, Green R, Kelso J, Prufer K, Meyer M, Krause J, Ronan M, Lachmann M, Pääbo S. 2007. Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *PNAS* 104:14616- 14621.
- Bodner M, Perego UA, Huber G, Fendt L, Rock AW, et al. 2012. Rapid coastal spread of First Americans: Novel insights from South America's Southern Cone mitochondrial genomes. *Genome Res* 22:811-820.
- Borrero LA, Barbarena R. 2006. Hunter-Gatherer Home Ranges and Marine Resources. *Current Anthropology* 47:855-867.

Borrero LA. 2008. Early Occupations in the Southern Cone. En: Silverman H, Isbell W Editores. *Handbok of South American Archaeology*. Springer. Pp. 59-77.

Bortolini M-C, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SPK, Bau CHD, Hutz MH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, et al. 2003. Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. *American journal of human genetics* 73:524-39.

Carpenter ML, Buenrostro JD, Valdiosera C, Schroeder H, Allentoft ME, Sikora M, Rasmussen M, Gravel S, Guillén S, Nekhrizov G, et al. 2013. Pulling out the 1%: Whole-Genome Capture for the Targeted Enrichment of Ancient DNA Sequencing Libraries. *Am J Hum Genet* 93 (5): 852-64.

Chatters JC, Kennett DJ, Asmerom Y, Kemp BM, Polyak V, Blank AN, Beddows PA, Reinhardt E, Arroyo-Cabrales J, Bolnick DA, Malhi RS, Culleton BJ, Erreguerena PL, Rissolo D, Morell-Hart S, Stafford TW Jr. 2014. Late Pleistocene human skeleton and mtDNA link Paleoamericans and modern Native Americans. *Science* 344, 750 -754.

Cifuentes L, Morales R, Sepúlveda D, Jorquera H, and Acuña M. 2004. DYS19 and DYS199 loci in a Chilean population of mixed ancestry. *American journal of physical anthropology* 125:85-9.

Coronato A, Salemrne M, Rabassa J. 1999. Palaeoenvironmental conditions during the early peopling of Southernmost South America (Late Glacial-Early Holocene, 14-8 ka B.P.). *Quaternary International* 53/54:77-92.

de Azevedo S, Nocera A, Paschetta C, Castillo L, Gonzalez M, Gonzalez-Jose R. 2011. Evaluating Microevolutionary Models for the Early Settlement of the New World: The Importance of Recurrent Gene Flow With Asia . *Am J Phys Anthropol* 146:539-552.

De Saint Pierre M, Bravi CM, Motti JMB, Fuku N, Tanaka M, Llop E, Bonatto SL, Moraga M. 2012. An alternative model for the early peopling of southern South America revealed by analyses of three mitochondrial DNA haplogroups. *PloS one* 7:e43486.

Dillehay TD. 2009. Probing deeper into first American studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:971-8.

Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations . *Molecular Ecology* 11: 2571-2581 .

Dupuy BM, Gedde-Dahl T, Olaisen B. 2000. DXYS267: DYS393 and Its X chromosome counterpart. *Forensic Sci Int.* 112(2-3):111-21.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.* 10: 564-567.

Fagundes NJR, Kanitz R, Eckert R, Valls ACS, Bogo MR, Salzano FM, Smith DG, Silva-Jr WA, Zago MA, Ribeiro-dos-Santos AK, et al. 2008. Mitochondrial population genomics supports a single pre Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Am J Hum Genet* 82:583-592.

Fiore D. 2006. La manipulación de pinturas corporales como factor de división social en los pueblos selk'nam y yámana (Tierra del Fuego) . *Estudios Atacameños* N° 31: 129-142.

García F, Moraga M, Vera S, Henríquez H, Llop E, Aspillaga E, Rothhammer F. 2006. mtDNA microevolution in Southern Chile's Archipelagos. *American Journal of Physical Anthropology* 129; 473-481.

García-Bour J, Pérez-Pérez A, Prats E, Turbón D. 2000. Molecular approach to the peopling of the Americas by sequencing mtDNA from extinct fuegians and patagons. *Chungara* 32:265-266.

García-Bour J, Pérez-Pérez A, Alvarez S, Fernández E, López-Parra AM, Arroyo-Pardo E, Turbón D. 2004. Early population differentiation in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia: ancient mtDNA sequences and Y-chromosome STR characterization. *American Journal of Physical Anthropology* 123:361-70.

Geppert M, Baeta M, Núñez C, Martínez-Jarreta B, Zweynert S, Cruz OWV, González-Andrade F, González-Solorzano J, Nagy M, et al. 2011. Hierarchical Y-SNP assay to study the hidden diversity and phylogenetic relationship of native populations in South America. *Forensic Science International. Genetics* 5:100-4.

Gilbert, T. 2006. Postmortem Damage of Mitochondrial DNA. En: *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens. Nucleic Acids and Molecular Biology* 18: 91-115.

Gilbert MTP, Jenkins DL, Gotherstrom A, Naveran N, Sanchez JJ, Hofreiter M, Thomsen PF, Binladen J, Higham TFG, Yohe II RM, Parr R, Cummings LS, Willerslev E. 2008. DNA from pre-Clovis human coprolites in Oregon, North America. *Science* 320:786.

Goebel T, Waters MR, O'Rourke DH. 2008. The Late Pleistocene Dispersal of Modern Humans in the Americas. *Science* 319 : 1497-1502 .

Gravel S, Zakharia F, Moreno-Estrada A, Byrnes JK, Muzzio M, et al. (2013) Reconstructing Native American Migrations from Whole-Genome and Whole- Exome Data. *PLoS Genet* 9(12): e1004023

Greenberg JH, Turner CG, Zegura SL. 1986. The settlement of the Americas: A comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Current Anthropology* 27: 477-497.

- Gusmão L, González-Neira A, Sánchez-Diz P, Lareu MV, Amorim A, Carracedo A. Alternative primers for DYS391 typing: advantages of their application to forensic genetics. *Forensic Sci Int.* 112(1):49-57.
- Gusinde, M. 1986 [1937]. *Los indios de Tierra del Fuego. Tomo II (1,2 y 3) (Yámanas)*. Buenos Aires: CAEA.
- Gusinde, M. 1991 [1974]. *Los indios de Tierra del Fuego. Tomo III (1 y 2) (Los Halakwulup)*. Buenos Aires: CAEA.
- Gusinde M. 1951. *Hombres primitivos en la tierra del fuego*. Traducción: Diego Bermudez Camacho. Escuela de Estudios Hispano-Americanos de Sevilla, Sevilla, España.
- González-José R, Martínez-Abadías N, Van Der Molen S, García-Moro C, Dahinten S, Hernández M. 2004. Hipótesis acerca del poblamiento de Tierra del Fuego-Patagonia a partir del análisis genético-poblacional de la variación craneofacial. *Magallania* 32: 79-98.
- Hernández M, Lalueza-Fox C, García-Moro, C. 1997. Fuegoian Cranial Morphology: The Adaptation to a cold harsh environment. *American Journal of Physical Anthropology* 103: 103-117.
- Hester J. 1966. Late Pleistocene environments and early man in South America. *The American Naturalist* 100 (914): 377-388.
- Heusser CJ. 1994. Quaternary paleoecology of Fuego-Patagonia. *Rev. IG Sao Paulo* 15:7-26.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312:282-284.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. 2001: Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics* 2: 353-359 .
- Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, et al. (1993) Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 10:23-47.
- Karafet T, Mendez F. 2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Research* 18:830-838.
- Kemp BM, Mahli RS, McDonough J, Bolnick DA, Eshleman JA, et al. 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
- Kemp B, Schurr, T. 2010. "Ancient and modern genetic variation in the Americas", en *Human Variation in the Americas: The Integration of Archeology and Biological Anthropology*, Southern Illinois University Press

Krause J. 2010. From Genes to Genomes: What is New in Ancient DNA? *Mitteilungen der Gesellschaft für Urgeschichte* 19 : 11-33 .

Lalueza C, Pérez-Pérez a, Prats E, Cornudella L, Turbón D. 1997. Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Human molecular genetics* 6:41-6.

Legoupil D., Béarez P., Lepetz S., San Román M., Salas K., 2007: De la pesca a la caza: evolución económica del sitio Stuken 1, al sur del golfo de Penas. En: F. Morello, M. Martinic, A. Prieto & G. Bahamonde (eds.), *Arqueología de Fuego-Patagonia. Levantando piedras,desenterrando huesos...y develando arcanos. Actas de las Sextas Jornadas de Arqueología de la Patagonia*. Punta Arenas, Ediciones CEQUA: 279-294

Legoupil D, Christensen M, Morello F. 2011. Una encrucijada de caminos: el poblamiento de la Isla Dawson (Estrecho de Magallanes). *Magallania* 39(2): 137-152.

Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-145

Martinic, M. 1989. Los canoeros de la Patagonia meridional: Población histórica y distribución geográfica (siglos XIX y XX). El fin de una etnia. *Journal de la Société des Américanistes*. Tomo 75: 35-61.

Miotti L. 2003. Patagonia: a paradox for building images of the first Americans during the Pleistocene/Holocene Transition. *Quaternary International* 109-110:147-173.

Miotti, L., Salemme MC. 2003. When Patagonia was colonized: people mobility at high latitudes during Pleistocene/Holocene transition. *Quaternary International* 109-110:95-111.

Miotti L, Salemme M. 2004. Poblamiento, movilidad y territorios entre las sociedades cazadoras-recolectoras de Patagonia. *Complutum* 15:177-206.

Meyer M, Kircher M, Gansauge MT, Li H, Racimo F, Mallick S, Schraiber JG, Jay F, Prüfer K, de Filippo C, et al. 2012. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science* 338: 222-226 .

Meyer M, Fu Q, Aximu-Petri A, Glocke I, Nickel B, Arsuaga JL, Martínez I, Gracia A, de Castro JM, Carbonell E, Pääbo S. 2013. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos . *Nature* 505: 403-6.

Moraga ML, Rocco P, Miquel JF, Nervi F, Llop E, et al. (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, De Saint Pierre M, Torres F, Ríos J. 2010. Vínculos de parentesco por vía materna entre los últimos descendientes de la etnia Kawéskar y algunos entierros en

los canales patagónicos: evidencia desde el estudio de linajes mitocondriales. *Magallania (Punta Arenas)* 38:103-114.

Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras AV, Acuña-Alonzo V, Sandoval K, Eng C, Romero-Hidalgo S, et al. 2014. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science* 344: 1280-5.

Mulligan CJ, Kitchen A, Miyamoto MM. 2008. Updated three stage model for the peopling of the Americas. *PLoS One* 3:e3199.

Neves WA, Pucciarelli HM. 1989. Extra-continental biological relationships of early South American human remains: a multivariate analysis. *Ciën. Cult.* 41: 566-575.

Neves WA, Pucciarelli HM. 1991. Morphological affinities of the first Americans: an exploratory analysis based on early South American human remains. *J. Hum. Evol.* 21: 261-273.

Orlando L, Ginolhac A, Zhang G, Froese D, Albrechtsen A, Stiller M, Schubert M, Cappellini E, Petersen B, Moltke I, et al. 2013. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499:74-8.

O'Rourke DH, Raff JA. 2010. The Human Genetic History of the Americas: The Final Frontier. *Current Biology* 20, R202-R207.

Orquera LA. 2005. Mid-Holocene littoral adaptation at the southern end of South America. *Quaternary International* 132:107-115.

Orquera LA, Piana EL. 2006. El poblamiento inicial del área litoral sudamericana sudoccidental. *Magallania (Punta Arenas)* 34:21-36.

Orquera LA, Gómez J. 2007. Los cazadores-recolectores de las costas de pampa, Patagonia y Tierra del Fuego. *Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología XXXII*: 75-99.

Orquera LA, Piana EL. 2009. Sea Nomads of the Beagle Channel in Southernmost South America: Over Six Thousand Years of Coastal Adaptation and Stability. *The Journal of Island and Coastal Archaeology* 4:61-81.

Orquera LA, Legoupil D, Piana EL. 2011. Littoral adaptation at the southern end of South America. *Quaternary International* 239:61-69.

Pääbo S. 1985. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.

Pääbo S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *PNAS* 86:1939-1943.

Pakendorf B, Stoneking M. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 6: 165-83.

Pearson O, Millones M. 2005. Rasgos esqueléticos de adaptación al clima y a la actividad entre los habitantes aborígenes de Tierra del Fuego. *Magallania* 33(1): 37-50.

Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, Kashani BH, Ritchie KH, Scozzari R, Kong Q-P, Myres NM, Salas A, Semino O, Bandelt H-J, Woodward SR, Torroni A. 2009. Distinctive Paleo-Indian Migration Routes from Beringia Marked by Two Rare mtDNA Haplogroups. *Current Biology* 19:1-8.

Pérez SI, Bernal V, González PN. 2007. Morphological Differentiation of Aboriginal Human Populations From Tierra del Fuego (Patagonia): Implications for South American Peopling. *American Journal of Physical Anthropology* 133:1067-1079.

Piana EL, Orquera LA. 2009. The Southern Top of the World: The First Peopling of Patagonia and Tierra del Fuego and the Cultural Endurance of the Fuegian Sea-Nomads. *Arctic Anthropology* 46:103-117.

Pucciarelli H. 2004. Migraciones y variación craneofacial humana en América. *Complutum* 15: 225-247.

Rabassa J, Coronato A. 2009. Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego during the Ensenadan Stage/Age (Early Pleistocene-earliest Middle Pleistocene). *Quaternary International* 210:18-36.

Raff JA, Bolnick DA, Tackney J, O'Rourke DH. 2011. Ancient DNA perspectives on American colonization and population history. *Am J Phys Anthropol.* 146(4): 503-14

Rasmussen M, Anzick SL, Waters MR, Skoglund P, DeGiorgio M, Stafford TW Jr, Rasmussen S, Moltke I, Albrechtsen A, Doyle SM, et al. 2014. The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana. *Nature* 506: 225-9

Raymond M, Rousset F. 1995 An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.

Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, Ray N, Parra M V., Rojas W, Duque C, et al. 2012. Reconstructing Native American population history. *Nature* 488:370-374.

Rizzi E, Lari M, Gigli E, De Bellis G, Caramelli D. 2012. Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genetics Selection Evolution* 44:21

Rocco P, Morales C, Moraga M, Miquel JF, Nervi F, Llop E, Carvallo P, Rothhammer. 2002. Composición genética de la población Chilena. Distribución de polimorfismos de DNA mitochondrial en grupos originarios y en la población mixta de Santiago. *Revista Médica de Chile* 130: 125-131.

- Rothhammer F, Dillehay TD. 2009. The Late Pleistocene Colonization of South America: An Interdisciplinary Perspective. *Ann Hum Genet* 73:540-549.
- Ruitberg CM, Butler JM. 2000. New primer sets for Y chromosome and CODIS STR loci. (Poster presented at the Eleventh International Symposium on Human Identification, Biloxi, MS).
- Salzano FM, Sans M. 2014. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genetics and Molecular Biology* 37(1) Suppl: 151-170.
- Shapiro B, Hofreiter M. 2014. A Paleogenomic Perspective on Evolution and Gene Function: New Insights from Ancient DNA. *Science* 343 : 1236573-1 /7.
- Scheinsohn V. 2003. Hunter-gatherer archaeology in South America. *Annu. Rev. Anthropol.* Vol. 32:339-61.
- Schurr TG, Ballinger SW, Gan Y-Y, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weiss KM, Wallace DC. 1990. Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian variants at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am J Hum Genet* 46:613-623.
- Schurr TG, Sherry ST. 2004. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *American Journal of Human Biology* 16:420-39.
- Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Glenn-Smith D, et al. 2007. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS ONE* 2:1-6.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tessone A, Zangrando FA, Barrientos G, Valencio S, Panarello H, Goñi, R. 2005. Isótopos estables del carbono en patagonia meridional datos de la cuenca del lago salitroso (provincia de Santa Cruz, República Argentina). *Magallania* 33(2): 21-28.
- Torróni A, Schurr TG, Cabell MF, Bown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53: 563-590.
- Underhill P, Kivisild T. 2007. Use of Y Chromosome and Mitochondrial DNA Population Structure in Tracing Human Migrations. *Annu. Rev. Genet.* 41:539-64
- Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA, Gallo C, et al. 2007. Genetic variation and population structure in Native Americans. *PLoS Genet* 3:e185.
- Willerslev E, Cooper A. 2005. Ancient DNA. *Proc. R. Soc. B* 272, 3-16

Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky L, Hammer MF. 2004. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Molecular biology and evolution* 21:164-75.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla MS1: Detalle de muestras

| Código | Información Museo | Ubicación (coordenadas) | mtDNA | Sexo | CromY | Notas |
|----------|---|------------------------------|--------|------|-------|------------------------------|
| IP01 (K) | Islote Tesner (Isla Dawson) | 53°49'60" S 70°24'0" W | D4h3a5 | FEM | - | 2000 AP Análisis genómico |
| IP03 (K) | ENGLEFIELD (54891) | 53°5'26" S 71°55'00" W | C1 | - | - | Moraga <i>et al</i> , 2010 |
| IP04 (K) | CUEVA DE LA CRUZ (D379) | 50°19'958" S 75°22'893" W | D4h3 | - | - | Moraga <i>et al</i> , 2010 |
| IP10 (K) | CANAL MAULE-1 (58272) | 53°29'57" S 73°45'28" W | D4h3 | - | - | Moraga <i>et al</i> , 2010 |
| IPK01 | Pto Natales Caverna-1 50107 | 49°8'0" S 74°25'0" W | D1 | - | - | Réplica EEUU: D |
| IPK02 | Canal Abra 55884 | 53°22'60" S 73°23'0" W | C? | - | - | Réplica EEUU: - |
| IPK03 | Rey Felipe 49076 | 53°38'00" S 70°54'00" W | D1g | - | - | Réplica EEUU: - |
| IPK04 | Ponsonby 54889 | 52°40' S 71°30' W | - | - | - | Réplica EEUU: - |
| IPK05 | Cueva Estrecho Trinidad 33832 en caja canales norte 33830 | 50°00'00" S 75°00'00" W | D4h3a5 | MASC | Q-M3 | |
| IPK06 | Cueva Estrecho Trinidad 33834 en caja canales norte 33830 | 50°00'00" S 75°00'00" W | D4h3a5 | FEM | - | |
| IPK07 | Canal Messier sector 2 49077 | 47°49'S 74°46'W | D4h3a5 | FEM | - | |
| IPK08 | Pto Natales Caverna-3 50109 | 49°8'0" S 74°25'0" W | D4h3a5 | MASC | Q-M3 | Análisis genómico |
| IPK09 | Cueva Estrecho Trinidad 33833 en caja canales norte 33830 | 50°00'00"S 75°00'00"W | D4h3a5 | MASC | Q-M3 | |
| IPK10 | Isla Riesco (estancia lola) 54890 | 52°42'10"S 72°12'7"W | D4h3a5 | MASC | Q-M3 | |
| IPK11 | Bahía Chilota (Porvenir) 73722 | 53°18' S 70°26' W | D1g | FEM | - | |

| | | | | | | |
|----------|-------------------------------------|--|--------|------|------|---------------------------------|
| IPK12 | Punta Santa María 77753 | 53°21'0" S 70°58'0" W | C1 | FEM | - | 900 AP. Análisis genómicos. |
| IPK13 | Yekchal 89013 Puerto Edén | 49° 8'23.48" S 74°27'7.26" W | D4h3a5 | MASC | Q-M3 | 1300 AP. Análisis genómicos. |
| IPY01 | Puerto Williams 12490 | 54°56'00" S 67°37'00" W | C1 | MASC | - | Réplica EEUU: C |
| IPY02 | Isla Navarino 27007 | 54°55'0" S 67°45'0" W | C1 | FEM | - | Réplica EEUU: - |
| IPY03 | Puerto Luisa 6790 | 54°56'00" S, 67°37'00" W | C1 | FEM | - | Réplica EEUU: - |
| IPY04 | Isla Navarino 850 | 55°04'5" S 67°40'0" W | C1 | MASC | Q-M3 | |
| IPY05 | Isla Navarino 1863 | 55°04'5"S 67°40'0"W | C1 | MASC | Q-M3 | |
| IPY06 | Isla Navarino Lauta -2 288 | 54°55'42" S 67°38'45" W | C1 | FEM | - | |
| IPY07 | Isla Navarino (seno Grandi) 6796 | 55°13'24.10" S 67°48'49.65" W | C1 | FEM | - | |
| IPY08 | Canasaca Hoste 6788 | 55°15' S 69°01' W | - | - | - | Sólo análisis genómico. |
| IPY09 | Isla Navarino 849 | 55°04'5" S 67°40'0" W | C1 | FEM | - | |
| IPY10 | Puerto Williams 12489 | 54°56'00" S 67°37'00" W | C1 | MASC | Q-M3 | Análisis genómico. |
| MG14 | OH014-Santa Rosa, Isla Navarino | 54°54'9.80" S 68°9'29.03" W | D4h3a5 | FEM | - | |
| MG15 | OH015-Caleta Eugenia, Km 22 | 54°56'57.23" S 67°14'35.50" W | C1 | FEM | - | |
| MG22 | OH022-Isla Mascart | 55°08'01" S 68°26'48" W | C1 | MASC | - | Réplica EEUU: C |
| MG23 | OH023-Wulaia | 55°3'38.02" S 68°9'11.08" W | C1 | FEM | - | |
| MG30a | OH30a-b Río Douglas | 55°10'8.47" S 68°7'17.31" W | C1 | MASC | Q-M3 | |
| MG30b | | | D1g | FEM | - | |
| MG-Otras | OH04 | 55°04'5" S 67°40'0" W Isla Navarino | C1 | MASC | - | Réplica EEUU: C |
| | OH10 | | C1 | FEM | - | Réplica EEUU: C |
| | OH11 | | C? | - | - | Réplica EEUU: C |
| | OH21 | | C1 | MASC | - | Réplica EEUU: C |

FEM=femenino; MASC=masculino. El - indica que no se obtuvo información en esa categoría.

Tabla MS2: Test exacto de diferenciación poblacional.

| | Aymara | Atacameño | Huilliche | Pehuenche | MapucheCHL | MapucheARG | Tehuelche | Kawéskar | Yámana | akawéskar |
|------------|----------------|----------------|----------------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Aymara | | | | | | | | | | |
| Atacameño | 0.07811±0.0055 | | | | | | | | | |
| Huilliche | >0.00001 | >0.00001 | | | | | | | | |
| Pehuenche | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | | | | | | | |
| MapucheCHL | 0.00882±0.0018 | 0.00573±0.0015 | 0.08417±0.0067 | >0.00001 | | | | | | |
| MapucheARG | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | 0.22898±0.0143 | | | | | |
| Tehuelche | >0.00001 | >0.00001 | 0.00094±0.0003 | >0.00001 | 0.06708±0.0049 | 0.00058±0.0004 | | | | |
| Kawéskar | 0.01404±0.0029 | 0.00462±0.0009 | >0.00001 | >0.00001 | 0.02886±0.0024 | 0.00004±0.0000 | 0.00052±0.0002 | | | |
| Yámana | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | 0.00005±0.0000 | | |
| akawéskar | 0.01530±0.0030 | 0.00160±0.0006 | 0.00026±0.0001 | >0.00001 | 0.00880±0.0016 | >0.00001 | 0.00706±0.0028 | 0.05908±0.0030 | 0.00012±0.0001 | |
| ayámana | 0.00149±0.0006 | 0.00046±0.0004 | >0.00001 | >0.00001 | 0.00081±0.0005 | >0.00001 | 0.00029±0.0003 | 0.00145±0.0006 | 0.01783±0.0026 | 0.00053±0.0002 |

Tabla MS3: Valores de Fst entre pares de muestras obtenidos a partir de secuencias. La parte inferior de la tabla muestra los valores de Fst, mientras que en la parte superior se indican los valores de p. En gris se destacan los valores de Fst no significativos.

| | Aymara | Atacameño | Huilliche | Pehuenche | MapucheCHL | MapucheARG | Tehuelche | Kawéskar | Yámana | akawéskar | ayámana |
|------------|---------|----------------|-----------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Aymara | | | | | | | | | | | |
| Atacameño | 0.01007 | 0.07524±0.0030 | >0.00001 | >0.00001 | 0.00861±0.0010 | >0.00001 | >0.00001 | 0.00030±0.0002 | >0.00001 | 0.00040±0.0002 | >0.00001 |
| Huilliche | 0.02842 | 0.03229 | >0.00001 | >0.00001 | 0.00386±0.0006 | 0.00010±0.0001 | >0.00001 | 0.00040±0.0002 | >0.00001 | 0.00020±0.0001 | >0.00001 |
| Pehuenche | 0.06774 | 0.06407 | 0.04948 | >0.00001 | 0.29750±0.0045 | 0.01030±0.0010 | 0.00059±0.0002 | 0.00020±0.0001 | >0.00001 | 0.00040±0.0002 | >0.00001 |
| MapucheCHL | 0.02070 | 0.02502 | 0.00443 | 0.03510 | 0.01653±0.0012 | >0.00001 | 0.00010±0.0001 | 0.00089±0.0003 | >0.00001 | 0.00059±0.0002 | >0.00001 |
| MapucheARG | 0.02624 | 0.03017 | 0.01307 | 0.04485 | 0.35462±0.0043 | 0.08791±0.0028 | 0.00703±0.0008 | 0.00030±0.0002 | 0.00050±0.0002 | 0.00010±0.0001 | >0.00001 |
| Tehuelche | 0.03566 | 0.04310 | 0.02803 | 0.06332 | 0.40252 | 0.00050±0.0002 | 0.00040±0.0002 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 |
| Kawéskar | 0.05222 | 0.05719 | 0.06245 | 0.08834 | 0.61777 | 0.03120 | 0.00050±0.0002 | >0.00001 | 0.00238±0.0005 | 0.00019±0.0001 | >0.00001 |
| Yámana | 0.08709 | 0.09756 | 0.10454 | 0.14286 | 0.04927 | 0.06158 | 0.07195 | 0.00416±0.0006 | 0.08415±0.0027 | 0.00198±0.0004 | >0.00001 |
| akawéskar | 0.06168 | 0.07035 | 0.06336 | 0.10998 | 0.09462 | 0.10520 | 0.11173 | 0.10713 | 0.00109±0.0004 | 0.01960±0.0014 | 0.00089±0.0003 |
| ayámana | 0.06637 | 0.09510 | 0.09898 | 0.13826 | 0.06902 | 0.07365 | 0.06905 | 0.13517 | 0.11677 | 0.08076 | 0.12876 |

Tabla MS4: Valores de Fst entre pares de muestras obtenidos a partir de frecuencias. La parte inferior de la tabla muestra los valores de Fst, mientras que en la parte superior se indican los valores de p. En gris se destacan los valores de Fst no significativos.

| | Aymara | Atacameño | Huilliche | Pehuénche | MapucheCHL | MapucheARG | Tehuelche | Kawéskar | Yámana | aKawéskar | aYámana |
|------------|---------|----------------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Aymara | | 0.21582±0.0116 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 |
| Atacameño | 0.01894 | | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 | >0.00001 |
| Huilliche | 0.31333 | 0.27280 | | 0.00293±0.0016 | 0.11719±0.0114 | 0.08008±0.0086 | 0.05566±0.0070 | >0.00001 | 0.00098±0.0010 | >0.00001 | >0.00001 |
| Pehuénche | 0.38470 | 0.35172 | 0.05317 | | 0.01562±0.0031 | >0.00001 | 0.00977±0.0029 | >0.00001 | 0.00098±0.0010 | >0.00001 | >0.00001 |
| MapucheCHL | 0.24989 | 0.21042 | 0.02766 | 0.07637 | | 0.12207±0.0101 | 0.17285±0.0117 | 0.00781±0.0031 | 0.02441±0.0057 | >0.00001 | >0.00001 |
| MapucheARG | 0.32403 | 0.28400 | 0.01934 | 0.14411 | 0.02478 | | >0.00001 | >0.00001 | 0.00098±0.0010 | >0.00001 | >0.00001 |
| Tehuelche | 0.28036 | 0.25251 | 0.03366 | 0.07969 | 0.02529 | 0.09031 | >0.00001 | 0.02246±0.0042 | 0.00879±0.0029 | 0.01562±0.0042 | >0.00001 |
| Kawéskar | 0.33632 | 0.29684 | 0.21077 | 0.29857 | 0.12988 | 0.22742 | 0.09482 | | 0.03711±0.0059 | 0.75293±0.0126 | >0.00001 |
| Yámana | 0.31456 | 0.28977 | 0.09585 | 0.15695 | 0.07033 | 0.14685 | 0.07575 | 0.09954 | | 0.00391±0.0023 | 0.00195±0.0014 |
| aKawéskar | 0.38682 | 0.36681 | 0.23989 | 0.32976 | 0.19878 | 0.27221 | 0.10022 | 0.09954 | 0.15159 | | >0.00001 |
| aYámana | 0.54750 | 0.53306 | 0.41834 | 0.49099 | 0.38253 | 0.41908 | 0.43125 | 0.36565 | 0.24115 | 0.46187 | |