

Aspectos biodemográficos de grupos étnicos Macro-Pano de Bolivia y caracterización genética de las poblaciones Aymará, Quechua, Chimane y Masetén

Francesc Bert i Fibla

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**ASPECTOS BIODEMOGRÁFICOS DE GRUPOS ÉTNICOS MACRO-PANO DE
BOLIVIA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES
AYMARÁ, QUECHUA, CHIMANE Y MOSETÉN**

Memoria presentada por

Francesc Bert i Fibla

Para optar al grado de

Doctor

por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado Biología Animal II: Antropología Biológica

(Bienio 2004-2005)

Dirigida por

Dr. Daniel Turbón Borrega, Catedrático de Antropología Física
Dr. Alejandro Martínez Pérez-Pérez, Profesor Titular de Antropología Física

Unidad de Antropología del Departamento de Biología Animal
Universitat de Barcelona

**ASPECTOS BIODEMOGRÁFICOS DE GRUPOS ÉTNICOS
MACRO-PANO DE BOLIVIA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA
DE LAS POBLACIONES AYMARÁ, QUECHUA, CHIMANE Y MOSETÉN**

Francesc Bert i Fibla

Dr. Daniel Turbón Borrega

Dr. Alejandro Martínez Pérez-Pérez

Barcelona, Marzo de 2011



A la memòria d'una dona decidida, la meva mare i al geni intrèpid del meu pare per aquell "Atlas del Mundo Animal" que un dia em va regalar.

AGRAÏMENTS

Voldria començar aquest capítol comentant que aquesta tesi doctoral és el resultat d'un treball fet any rera any; aprenentatge rera aprenentatge; article per article i en definitiva colze a colze amb l'Alfons Corella. Crec que amb l'Alfons hem fet una bona feina d'equip, i això que l'hem passat de tots colors tant a l'hora de recollir les mostres, com quan treballàvem durant hores al laboratori de la Facultat o quan discutíem sobre el que acabariem escrivint en els articles. També és cert que amb tu Alfons hem rigut molt... i ens ho hem passat bé estudiant una gent que estimem i ens fascina, no ho canviariem per res, oi?. "Alfons, it's up to you". Als altres companys de l'aventura boliviana Dani i Sol, dir-vos que quan vulgueu hi tornem que el país és gran.

A la Maria Àngels agrair-li la comprensió i l'empenta que m'ha donat en tot moment per assolir aquest treball, sense tu moltes coses de la meva vida haurien estat minúscules.

Als meus fills Marçal i Jana, als que estimo moltíssim i que han crescut sentint parlar de la tesi del seu pare, espero que no ho hagueu viscut com quelcom abominable i us agraeixo la paciència que a vegades jo no he tingut. En "Popeye" està esperant que li expliqueu de que va tota aquesta feina.

També voldria agrair al Dr. Nadal l'entusiasme i la confiança que ens va transmetre perquè ens aventuréssim en aquest projecte.

Especialment, també vull donar les gràcies als meus directors de tesi en Daniel Turbón i Alejandro Martínez Pérez-Pérez per creure en aquest estudi des de el primer dia i per ensenyar-me a moure'm en el Món de la recerca, el vostre enfoc, suggerències i correccions han tingut un gran valor.

A la meva família, Francesc, Roser, Carme, Toni, Joan Manel, Montse, Joan, Antonio, Laia, Fabio, Mar, Andrés, Paula i Gerard, donar-vos les gràcies per tots els cops a l'esquena seguits de la pregunta de... Què, com portes la tesi? Quan l'acabaràs? Va per tots vosaltres.

Tampoc voldria oblidar a tota la gent que a Bolívia, en algun moment van orientar i col·laborar en aquest estudi; el pares Cerdà, Albó, Jordà i Martín Bauer. A la Dra. Roser Montagut i la Dra. Greet Diltiens, als Drs. Castro i Toro, als companys Alvaro Gaditano, Martha Yevara, Isabel Galarza, Pepe, Rafael Anze i Ludi, al cònsol d'Espanya a Bolívia Carmelo Angulo, a la responsable i administradora de la Reserva Biològica del Beni Carmen Miranda a l'Alfredo, al guies Tito Zelada i Duvir Vaca, a doña Anita y doña Justí de la Quinta de San Ignacio, als responsables del Instituto Nacional de Estadística Ramiro Guerra i Nora Tesanos i Orval Andina, a l'Ana María Lema de la Secretaria de Asuntos Étnicos, al cartògraf Nicolás Ríos i al responsable del Departamento de Estadística del INE David Murillo.

A tots els membres de la Secció d'Antropologia del Departament de Biologia Animal de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona i especialment a la Dra. Clara García i als Drs. Miquel Hernández i Pedro Moral.

També vull donar les gràcies a totes les persones de les comunitats de Bermeo, Santa Rosa, San José del Cavitú, San Pastor, Carmen del Aperecito, Santa Rita, Santa Rosa, Chontal, Carmen del Maniquí, Aguas Negras, Montegrande, Villa Esperanza, Puerto Moseruna, San Juan de Cuverene, Puerto San Borja, Totaizal, Palos Blancos, Fátima de Chimanes, Santa Ana de Mosetenes i San Ignacio que vàrem visitar i que ens van donar aixopluc i saviesa durant els dies que vàrem estar amb ells.

Finalment dir que l'elaboració d'aquesta tesi doctoral ha estat un procés llarg, segurament massa llarg... de manera que potser, ara és hora de ser breu i simplement dir que en aquest Món sempre hi haurà més coses per fer que fetes, aquí en va una.

CONTENIDO

CONTENIDO

Prefacio	1
1. Introducción	7
1.1 Características fisiográficas y ubicación del área de estudio	9
1.1.1 La Región Andina	12
1.1.1.1 El Altiplano	13
1.1.1.2 Los Valles Templados	14
1.1.2 La Región Subandina	14
1.1.2.1 Los Yungas	14
1.1.2.2 El Piedemonte	15
1.1.3 La Región Amazónica y los Llanos Orientales	16
1.1.3.1 Las Llanuras	17
1.1.3.1.1 Los Llanos del Beni	18
1.1.3.1.2 Los Llanos del Chaco	23
1.1.3.2 El Escudo Brasileño	24
1.1.3.3 Las Serranías Chiquitanas	24
1.2 Estacionalidad climática en el Beni	25
1.3 Antecedentes históricos de los llanos de Moxos	27
1.4 Antecedentes históricos del Piedemonte	29
1.5 La población Amerindia de Sudamérica y Bolivia	31
1.5.1 La situación de la población Amerindia en Centro y Sudamérica	31
1.5.2 La población Amerindia en Bolivia	31
1.6 Biodemografía	36
1.6.1 Pirámides de edad	38
1.6.2 Estructura poblacional por sexo	40
1.6.3 Migración	43
1.6.3.1 Migración neta absoluta	43
1.6.3.2 Migración neta reciente	46
1.6.4 Tasas globales de fecundidad	48
1.6.5 Fecundidad según edad de la madre	52
1.7 Recogida de muestras	54

1.7.1	Muestras de cabello	56
1.7.2	Muestras de sangre	57
1.8	La Mitocondria	60
1.9	Extracción del ADN	62
1.10	La reacción en cadena de la polimerasa	62
1.11	El ADN mitocondrial	70
1.11.1	El ADNmt como herramienta genética	72
1.11.2	Herencia materna	73
1.11.3	Tasa de mutación	73
1.11.4	Poliplasmia y Heteroplasmia	74
1.11.5	Medida de la diversidad	76
1.11.6	La Antepasado Mitocondrial	77
1.11.7	La Interpretación de los Datos Mitocondriales	80
1.11.8	Relaciones filogenéticas mitocondriales	82
1.12	El ADN del cromosoma Y	83
1.12.1	Microsatélites del cromosoma Y	85
1.12.2	Marcadores bialélicos del cromosoma Y	86
1.12.3	Importancia poblacional de los polimorfismos del cromosoma Y	87
1.13	El ADN autosómico	87
1.13.1	Los STR's (<i>Short tandem repeats</i>)	88
1.13.2	STR's utilizados	90
1.14	Marcadores genéticos y filogenia humana	92
1.14.1	Filogenia del ADN mitocondrial	93
1.14.2	Filogenia del cromosoma Y	97
1.15	Tratamiento estadístico	100
1.15.1	Análisis de la varianza molecular y $\hat{\theta}$ de Weir	100
1.15.2	Análisis de componentes principales (PCA)	101
1.15.3	<i>Networks</i> filogenéticos	102
1.15.4	Algoritmo UPGMA	103
1.15.5	Índices de diversidad	104
1.15.5.1	Número y % de sitios polimórficos	104
1.15.5.2	Diversidad haplotípica	104

1.15.5.3	Número medio de diferencias por parejas y diversidad nucleotídica	105
1.15.6	Distribución de las diferencias por parejas. <i>Mismatch distribution</i>	106
1.15.7	Análisis filogenético interpoblacional	106
1.15.7.1	Distancias genéticas	106
1.15.7.2	Reconstrucción filogenética a partir de distancias genéticas	107
1.15.8	Equilibrio Hardy-Weinberg	108
2.	Objetivos	109
2.1	Objetivos generales	111
2.2	Objetivos específicos	113
3.	Publicaciones	119
3.1	Informe de los Directores de tesis	121
3.2	Quechua Amerindian population characterized by HLA-DQA1, YNZ22,3' APO B, HUMTH01 and HUMVWA31A polymorphisms. 1998. <i>J. Forensic Sci.</i> 43 (2): 403-405	125
3.3	Population study of Aymara Amerindians for the PCR-DNA polymorphisms HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQA1. 2000. <i>Int. J. Legal Med.</i> 113 : 126-128	131
3.4	Major Mitochondrial DNA Haplotype Heterogeneity in Highland and Lowland Amerindian Populations from Bolivia. 2001. <i>Hum Biol.</i> 73 :1-16	137
3.5	Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracaré Amerindian populations from Bolivia lowlands. 2004. <i>Ann Hum Biol.</i> 31 (1): 9-28	157
3.6	Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian Populations living in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Masetén, Aymara and Quechua. 2007. <i>Ann Hum Biol.</i> 34 (1): 34-55	179
3.7	Genetic structure of the population of Beni Department (North Bolivia). 2008. <i>For Sci Int.</i> 1 : 348-349	209

3.8	HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms in Amerindian populations living in the Beni Department of Bolivia. 2008. <i>Ann Hum Biol.</i> 35 (5): 556- 564	213
3.9	Y-chromosome haplotypes defined by 17 STR's included in AmpFI STR Yfiler PCR Amplification Kit in a multi ethnic population from El Beni Department (North Bolivia). 2009. <i>Leg Med</i> , 11 (2): 101-103	227
3.10	Piedmont and Llanos de Moxos living populations in the Beni Department (Bolivia) characterized by HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms. (en preparación)	233
4.	Discusión	255
4.1	Aspectos biodemográficos de los grupos Macro-Pano del Piedemonte	257
4.1.1	La etnia Chimane	260
4.1.2	La etnia Mometén	264
4.1.3	La etnia Chacobo	268
4.1.4	La etnia Cavineño	273
4.1.5	La etnia Tacana	276
4.1.6	La etnia Maropa	279
4.1.7	La etnia Esse-Ejja	281
4.1.8	La etnia Quechua	284
4.1.9	La etnia Aymará	288
4.2	Los Datos Genéticos	292
4.3	Discusión General	302
5.	Conclusiones	315
5.1	Generales	317
5.2	Demográficas	317
5.3	Poblacionales y filogenéticas	318
6.	Bibliografía	323

PREFACIO

La tesis que aquí se presenta recopila los datos recogidos durante tres campañas de muestreo e investigación en el Oriente boliviano (Departamento del Beni) y el análisis posterior de éstos en la *Secció d'Antropologia del Departament de Biologia Animal de la Facultat de Biologia* en la Universitat de Barcelona.

Las poblaciones estudiadas son pertenecientes a las etnias Aymará, Quechua, Chimane y Mositén.

El formato del presente trabajo sigue el modelo de tesis por artículos, ocho de los artículos presentados han sido publicados en revistas científicas internacionales mientras que uno está actualmente sujeto a valoración para su posible publicación. La tesis, también describe algunos parámetros demográficos de las poblaciones indígenas de Bolivia y los analiza para las etnias de lengua Macro-Pano-Tacana que actualmente viven en el Piedemonte sub-andino.

El análisis de la situación de las poblaciones Sudamerindias actuales pone de manifiesto que todavía se notan los efectos del impacto provocado por la llegada de europeos y africanos a partir del siglo XV, este impacto no sólo se debió al mestizaje, proceso que en sí mismo, es intrínseco en la historia de muchas poblaciones humanas; sino también a fenómenos de reducción del tamaño poblacional, migraciones forzosas o confinamientos en áreas geográficas limitadas.

Un buen ejemplo de estos procesos, lo encontramos en las crónicas de las expediciones de Orellana a lo largo del río Amazonas en 1542 (Carvajal 1934).

Las crónicas de las expediciones de Orellana que precedieron un periodo de despoblamiento masivo de muchas zonas de Sudamérica debido a la introducción de epidemias procedentes de Europa; explican que en el siglo XVI los exploradores europeos se impresionaron de la presencia humana y sus vestigios en los llanos y selvas amazónicas, y en menor medida en las zonas del Piedemonte andino, donde se hallan las cabeceras de los ríos tributarios al Amazonas.

ASPECTOS BIODEMOGRÁFICOS DE GRUPOS ÉTNICOS MACRO-PANO DE BOLIVIA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES AYMARÁ, QUECHUA, CHIMANE Y MOSETÉN

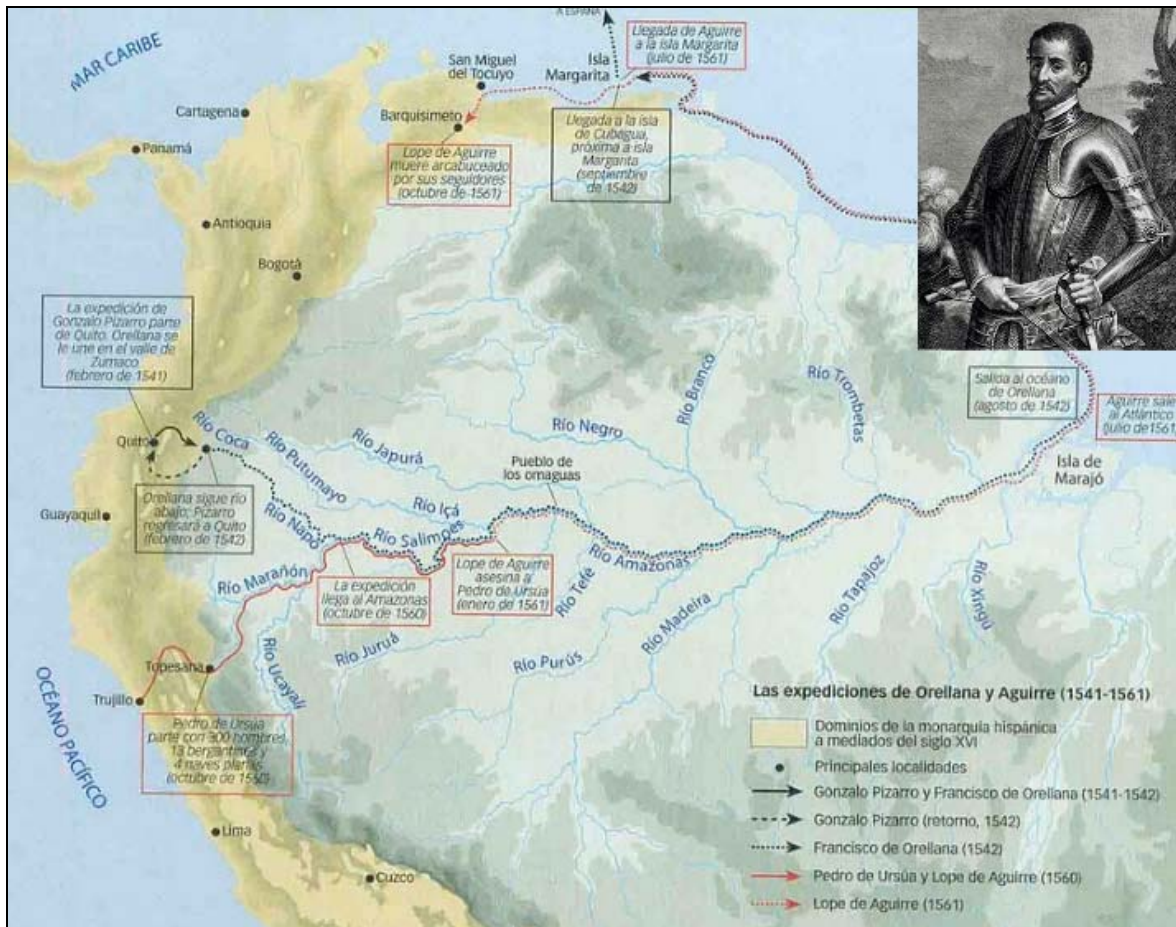


Fig. 1 Expediciones de Orellana y Aguirre a lo largo del Amazonas hasta el altiplano andino.

En 1588 Francisco de Angulo citó por primera vez a las etnias del Piedemonte y de los Llanos de Bolivia (Sánchez, 2008)

En estas regiones, estructuras como; lomas artificiales, canales y camellones (elevaciones del terreno para poder cultivar en épocas de inundación) ocupan inmensas áreas que, actualmente se pueden apreciar desde el aire y que despertaron a los estudiosos todo tipo de hipótesis sobre si su origen era natural o artificial (Denevan 2001; Neves 1999; Heckenberger 1996; Heckenberger 2002, Barba et al. 2003, Erickson 2000, 2006).

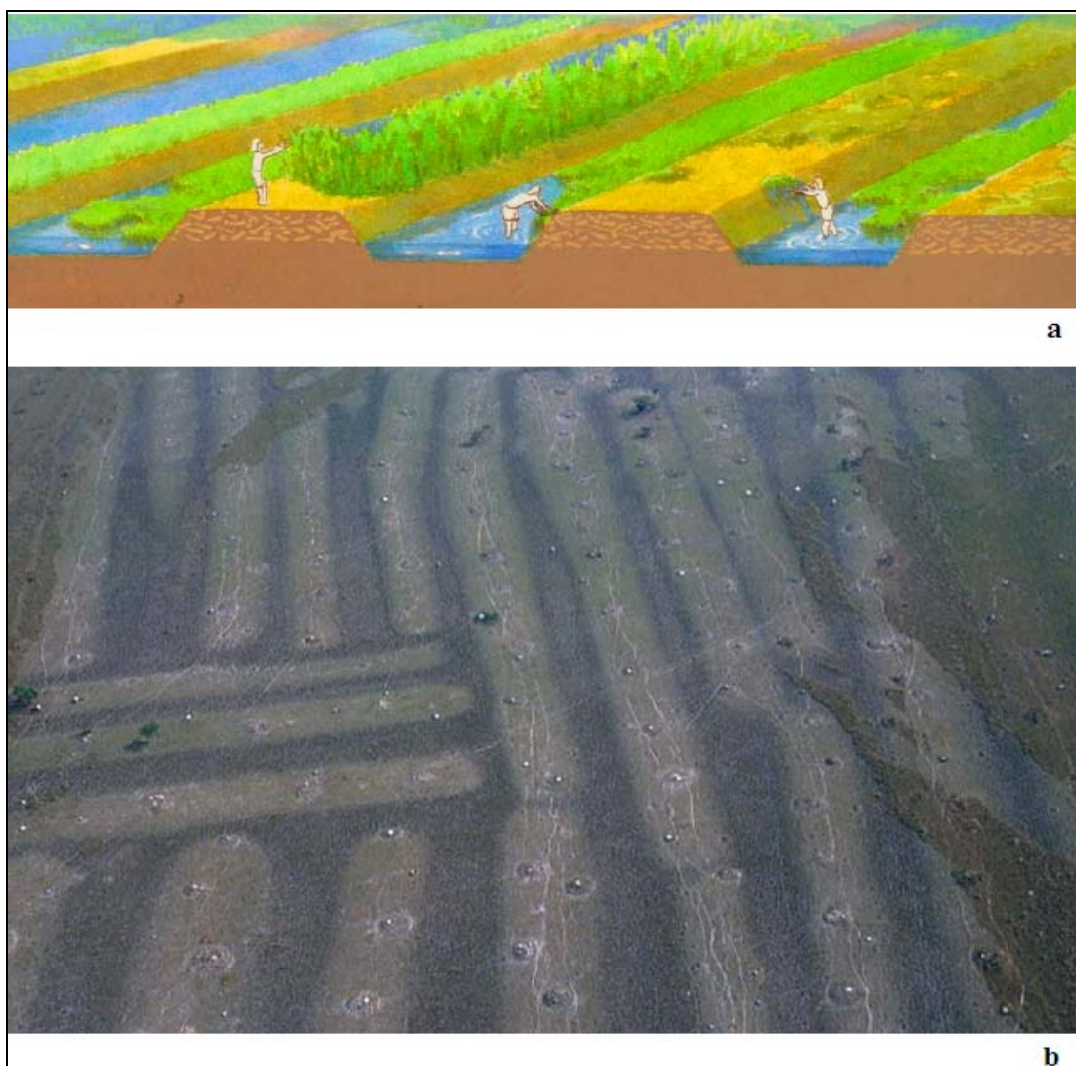


Fig. 2 a. Representación del trabajo en los camellones, b. Fotografía aérea de antiguos camellones en el Departamento del Beni (Bolivia)

Éstas estructuras informan de los asentamientos, centros ceremoniales y de actividad agrícola y pesquera que se desarrolló en el Oriente Boliviano antes de la llegada de los primeros españoles y que debió sustentar tamaños poblacionales relevantes (Lee 1979, Erickson 1999, Denevan 1996, 2001). Al oeste de los Llanos, la zona del Piedemonte Subandino jugó un papel crucial en la economía de intercambio entre el Mundo andino y el amazónico (Meyers 2002). Si a estos hechos se añaden los descubrimientos de asentamientos con zanjas protectoras (Neves 1999, 2001; Heckenberger et al. 1999; Petersen et al. 2001), la presencia de multitud de urnas funerarias (Guapindaia, 2001) es obvio que la región subandina y amazónica estuvo densamente poblada antes de 1492.

A finales del siglo XVII después de múltiples conflictos, epidemias y procesos de esclavitud, solo quedaría en la región una traza de lo que en el pasado fue una región

demográfica y culturalmente próspera. Las culturas de los Llanos y del Piedemonte, basadas en el uso de productos orgánicos como la madera, fibras vegetales, pieles y plumas dejaron pocos vestigios de su existencia si exceptuamos la gran cantidad de cerámica hallada en toda la región. En esta situación, sólo los grupos humanos que vivían en las cabeceras de los ríos del Piedemonte o que fueron desplazados a ellas pudieron mantenerse fuera de la aculturación y la influencia de los europeos. Al llegar los siglos XIX i XX las sucesivas colonizaciones europeas de la región valoraron las etnias que allí vivían como la antítesis de la cultura contraponiéndola a la cultura andina.

La presente tesis trata de definir algunos aspectos de la situación demográfica y describir la genética poblacional a partir del estudio de haplogrupos del ADN mitocondrial (ADNmt), secuenciación de la región de control d-loop del ADNmt (HVRI), de microsatélites autosómicos, *short tandem repeats* (STR's) y microsatélites del cromosoma Y de un grupo de etnias asentadas en el Piedemonte del Departamento del Beni de Bolivia. Las poblaciones Mosestén y Chimane son autóctonas de la zona mientras que las poblaciones Aymará y Quechua deben considerarse colonas en la región ya que su área de poblamiento original se halla en otros departamentos, mayoritariamente andinos. Las poblaciones autóctonas, si bien presentan una cultura común, pertenecen a grupos lingüísticos claramente diferenciados. Las etnias Mosestén y Chimane son de habla Ge-Pano-Caribe, mientras que las poblaciones Aymará y Quechua pertenecen al *stock* de lenguas Andinas (Ruhlen, 1991). La etnia Chimane habita en las montañas ubicadas en la provincia de Ballivián en el Departamento del Beni, desde el río Quiquibey, hasta las cabeceras de los ríos Matos, Chevejecure, Chimane y Cuverene y entre el río Maniqui y la ciudad de San Borja, este territorio se ha mantenido invariable en los últimos siglos.

Según el Diagnóstico socioeconómico del Bosque Chimanés (1990), La etnia Mosestén se halla en las cabeceras de los ríos Santa Elena y en el curso alto del río Beni, en las zonas limítrofes del departamento del Beni con el departamento de La Paz.

Las poblaciones Aymará y Quechua ocupan diversos países andinos, pero en Bolivia, los Aymará se distribuyen mayoritariamente en los departamentos de La Paz, Oruro y Potosí mientras que la población Quechua habita los departamentos de Cochabamba y Chuquisaca siendo los límites superpuestos y poco definidos.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características fisiográficas y ubicación del área de estudio

Bolivia es un país sudamericano considerado andino situado entre los paralelos 9° 38' y 22° 53' latitud Sur, y entre los meridianos 57° 26' y 69° 38' longitud Oeste de Greenwich. Al Norte y al Este limita con Brasil, al Sur con Argentina, al Oeste con Perú, al Sudeste con el Paraguay y al Sudoeste con Chile. La superficie del país es de 1.098.581 Km² (I.N.E. 1980), ocupando el quinto lugar entre los países sudamericanos después de Brasil, Argentina, Perú y Colombia.



Fig. 3 Mapa político de Sudamérica.

Políticamente el país se divide en nueve Departamentos (La Paz, Chuquisaca, Cochabamba, Santa Cruz, Oruro, Potosí, Tarija, Beni y Pando) con un total de 108 provincias. (Montes de Oca, 1995)

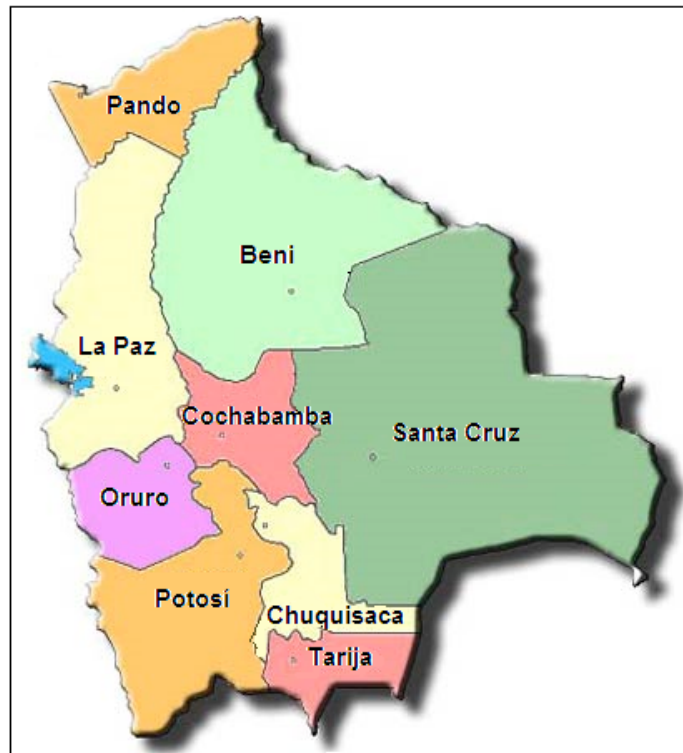


Fig. 4. Los nueve Departamentos de Bolivia

La capital del Departamento del Beni es Trinidad, pero existen otras ciudades singulares como; San Ignacio de Moxos y San Borja. La primera es la capital de la provincia de Moxos, el centro de la actividad económica del Departamento y el punto mejor comunicado de la provincia.

San Ignacio se comunica con el resto del país por dos rutas: una pista que lo une con La Paz (400 Km), transitable solamente una parte del año. Cuando no es transitable, la comunicación con la capital se tiene que hacer mediante otra ruta, de uso casi permanente, es la que une San Ignacio con Santa Cruz; con un rodeo de 1400 Km con las siguientes etapas: Trinidad, 97 Km de pista en buen estado que hasta hace poco tiempo precisaba de barcazas para el paso de los ríos; Santa Cruz, 400 Km de pista en mal estado; Cochabamba, 400 Km con algunos tramos en mal estado; La Paz, 400 Km de carretera en buen estado y de uso regular.

Fisiográficamente, en el territorio boliviano se consideran tres zonas predominantes (Montes de Oca 2001):

- La **región andina** (Altiplano, Cordillera occidental y Cordillera oriental). La zona se halla a más de 3.000 m.s.n.m. (metros sobre el nivel del mar)
- La **región subandina** Corresponde a la región intermedia entre la zona andina y los Llanos, comprende los valles y los yungas a unos 2.500 m.s.n.m. la región se caracteriza por su actividad agrícola.
- Los **llanos y amazonía**. Corresponde a una zona de llanuras y bajas mesetas cubierta por extensas selvas o sabanas.

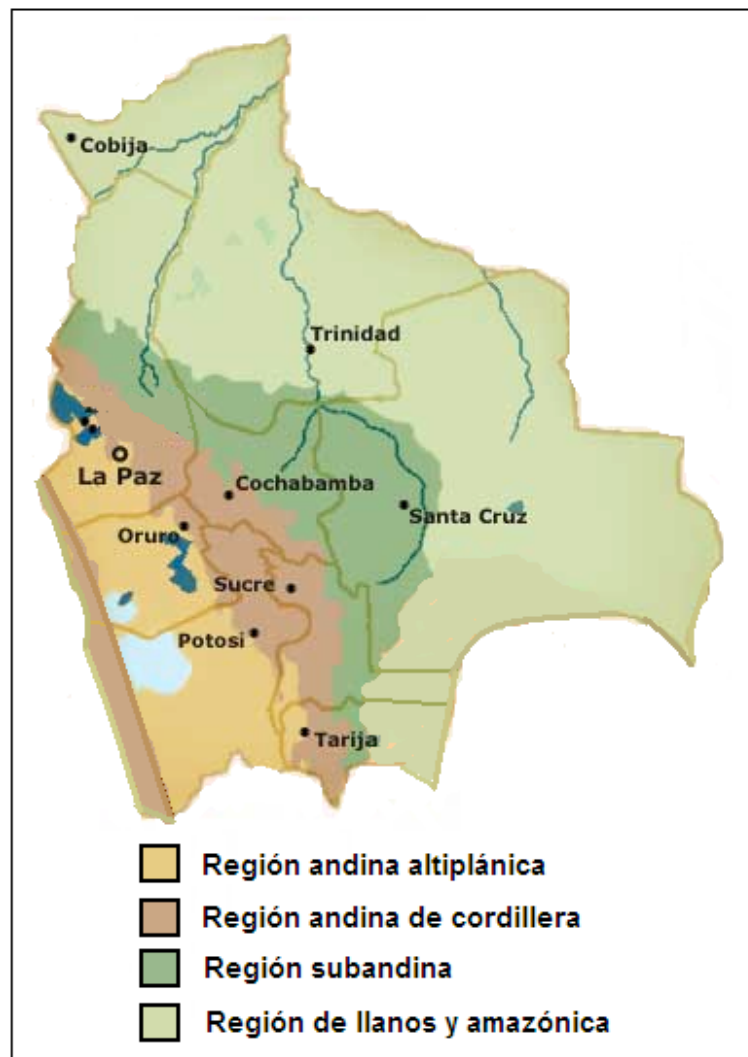


Fig. 5 Ecorregiones principales de Bolivia.

Zonas geográficas		Extensión (Km ²)	%
Andina	Altiplano	136.229	12,40
	Cordillera occidental	12.000	1,10
	Cordillera oriental	172.195	15,67
Sub-andina		94.000	8,56
Amazónica y Llanos		684.007	62,26
Superficie urbana		150	0,01
Total		1.098.581	100,00

Tabla 1 Extensión total y relativa de las principales zonas geográficas de Bolivia

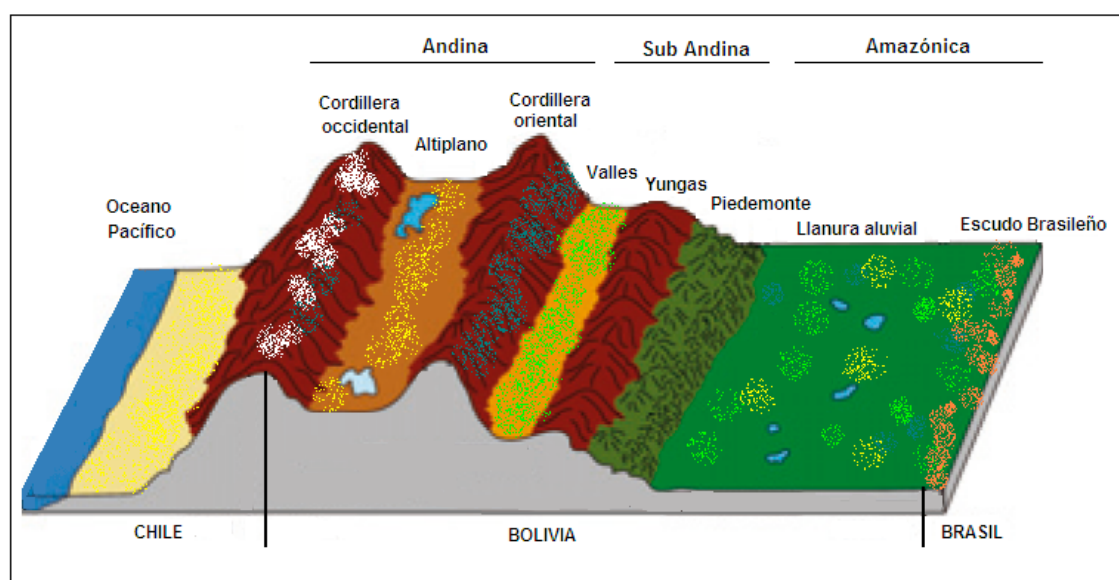


Fig. 6 Perfil Oeste-Este de Bolivia y situación de las principales zonas geográficas

1.1.1 La Región Andina

En los Andes existen una gran cantidad de nichos ecológicos diferentes a partir de los 2000 metros sobre el nivel del mar. Encontramos tres zonas bien definidas, el altiplano con los subsistemas puna (alto y frío), suni (más moderado) y los valles templados.

1.1.1.1 El Altiplano

Se llama altiplano la planicie (entre 3750 y 5200 m.s.n.m.) que se ubica entre las dos cordilleras andinas, oriental i occidental. Normalmente encontramos un paisaje abierto, pero es posible hallar restos de bosques de especies nativas que formaron parte importante del paisaje original de esas tierras. Al norte, suele ser más húmedo y al sur más árido. Las temperaturas medias anuales son inferiores a los 10° C, las heladas sobrepasan los 100 días al año y pueden ocurrir en cualquier mes. El balance hídrico es por lo general negativo: los cielos, despejados la mayor parte del año y la altitud, originan una alta evaporación en toda la región. Las heladas y la amplia variabilidad térmica diaria, determinan una limitación de la diversidad biológica.



Fig. 7 El altiplano con el lago Titicaca y la cordillera oriental al fondo. Fot. F. Bert

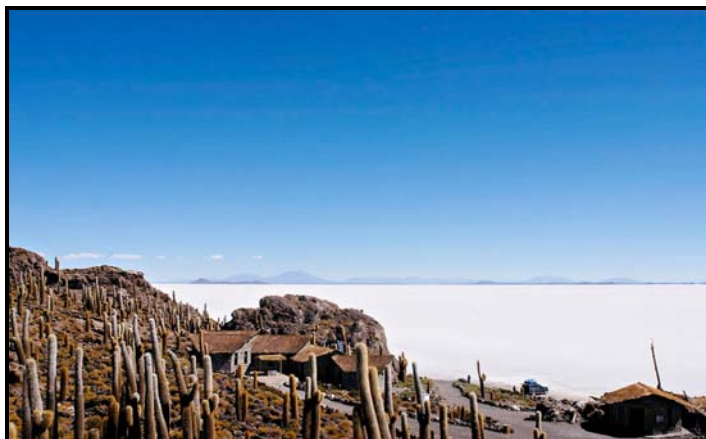


Fig. 8 El Salar de Uyuni en el altiplano boliviano. Fot. Evandro Malqueiro

1.1.1.2 Los Valles Templados

En los valles templados encontramos temperaturas medias anuales entre 2° y 18° y las altitudes se hallan entre los 1200 y 3600 m.s.n.m. Las variaciones térmicas entre estaciones son mínimas y las heladas escasas y poco intensas.



Fig. 9 Valles de Cochabamba.

1.1.2 La Región Subandina

La zona del subandino se encuentra entre la cordillera oriental de los Andes y los Llanos y está formada por serranías paralelas entre sí que presentan una dirección general noroeste-sureste.

1.1.2.1 Los Yungas

El vocablo “yunga” tiene su origen en la lengua quechua, y significaba “valle cálido”. Esta región fue denominada por los incas y así la conocieron los españoles a su llegada a Bolivia y al Perú, Los españoles utilizaron el término “yunga” para a los hombres que habitaban en la zona como el idioma que éstos hablaban.

La región de los Yungas acompaña a los Andes desde Colombia y Venezuela hasta el noroeste de Argentina pero es en Bolivia donde la espectacularidad de esta región se hace máxima. Los Yungas presentan un relieve típico de montaña, en el que predominan las

pendientes que pueden ser muy acusadas, el área presenta por lo general una topografía abrupta, que acompañan los cauces de ríos y quebradas, así como pequeños microvalles rodeados de majestuosas serranías, muchas veces ocupadas por campesinos trashumantes. La altitud de los Yungas varía según la latitud pero oscila entre 3000 m.s.n.m. hasta los 500 m.s.n.m.

En los yungas las temperaturas son siempre superiores a los 17° C, no existen grandes variaciones térmicas. Las pendientes y la elevada pluviosidad originan suelos lavados con la consecuente pérdida de fertilidad. Las precipitaciones son intensas y la vegetación exuberante.



Fig. 10 Las Yungas. Fot. Enrique Daniel

1.1.2.2 El Piedemonte

La zona de transición entre las últimas estribaciones de las serranías sub-andinas y la llanura central se denomina zona de Piedemonte.

El Piedemonte se caracteriza por una marcada estacionalidad climática y por una acusada variabilidad de precipitaciones que consecuentemente, hace variar el aporte de sedimentos en toda la región. Se sabe que la dinámica fluvial de la zona ha variado mucho en los últimos siglos debido en parte a cambios climáticos a corto plazo y a un aumento del impacto humano en toda la región (May 2008)

La región de Piedemonte se caracteriza por paisajes ondulados y por un clima de transición con niveles de precipitación relativamente altos (3000 mm anuales en Yucumo). El ecosistema predominante es el bosque tropical en transición hacia subtropical siempreverde (CIDDEBENI 1990).

La zona del Piedemonte incluye una gran diversidad de ecosistemas y ha sido históricamente una zona de alta diversidad cultural. Debido a su situación estratégica y sus condiciones geográficas, la región ha protagonizado extensos periodos de encuentros e intercambios económicos y culturales (Dudley 2009).

1.1.3 La Región Amazónica y los Llanos Orientales

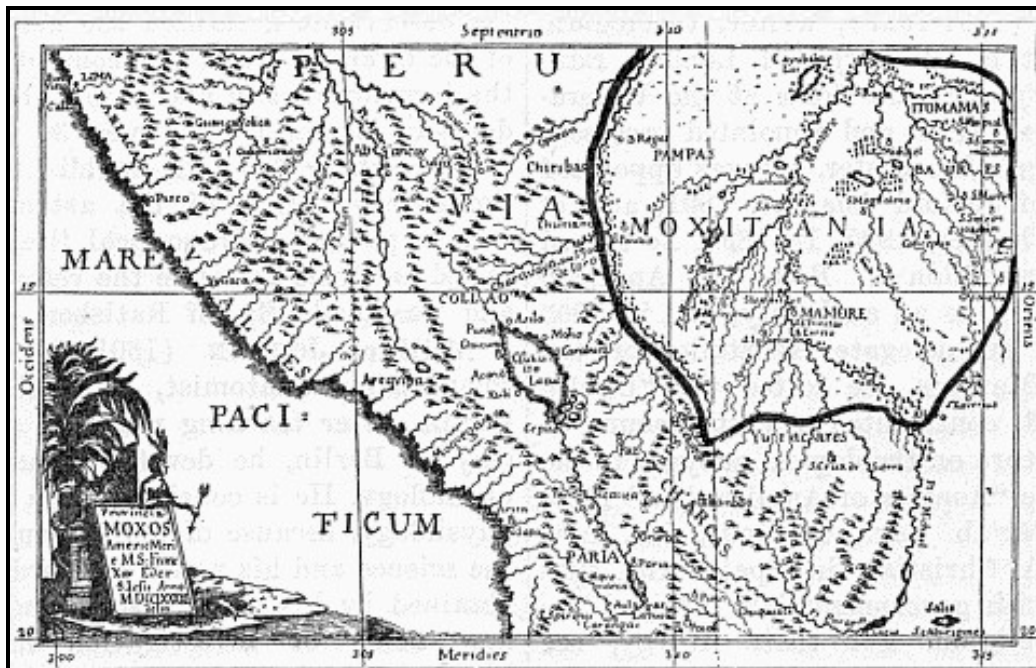


Fig. 11 Mapa histórico de la Moxitania o área de Moxos en el s. XVII

Aunque Bolivia se relaciona más con el altiplano andino que con las tierras bajas de la amazonía, Bolivia es el país con mayor cuenca amazónica en su espacio nacional (Zeitum, 1991).

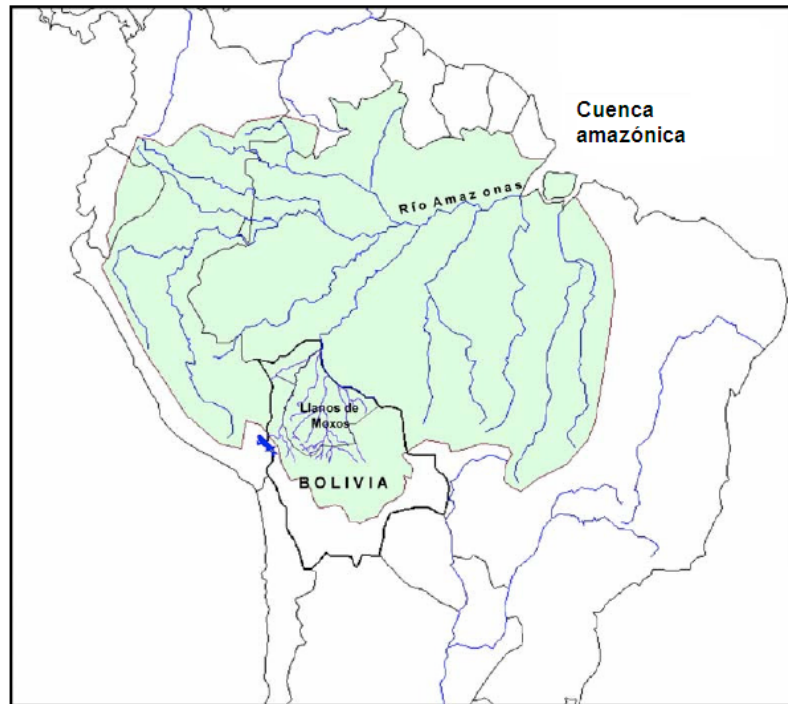


Fig. 12 Cuenca del río Amazonas según Barba J

En los Llanos también llamados tierras bajas del Oriente, se definen las subzonas de: Llanuras, Escudo Brasileño y Sierras Chiquitanas (Montes de Oca, 1989).

1.1.3.1 Llanuras

La cuenca amazónica con más de 7 millones de kilómetros cuadrados de superficie, ocupa el 4,8 % de la superficie terrestre y recoge el 19 % de las aguas dulces del planeta.

En Bolivia, donde existen varios ríos tributarios al Amazonas, una de las cuencas más importantes es la del río Madre de Dios (Madeira en Brasil). La cuenca del Madre de Dios, de la que los ríos Beni, Itonamas y Mamoré forman parte, está limitada al oeste por los Andes, y al norte y al este por un arco del Escudo Precámbrico Brasileño, en el que las aguas han abierto un estrecho paso con numerosos rápidos por el que vierten al Amazonas (Zeitum, 1991). La formación de estas llanuras corresponde a la acumulación de sedimentos transportados desde la Cordillera andina por el Oeste y desde el Escudo Brasileño Precámbrico por el Este. A lo largo de millones de años estos sedimentos han estado transportados por los ríos de ambos flancos.

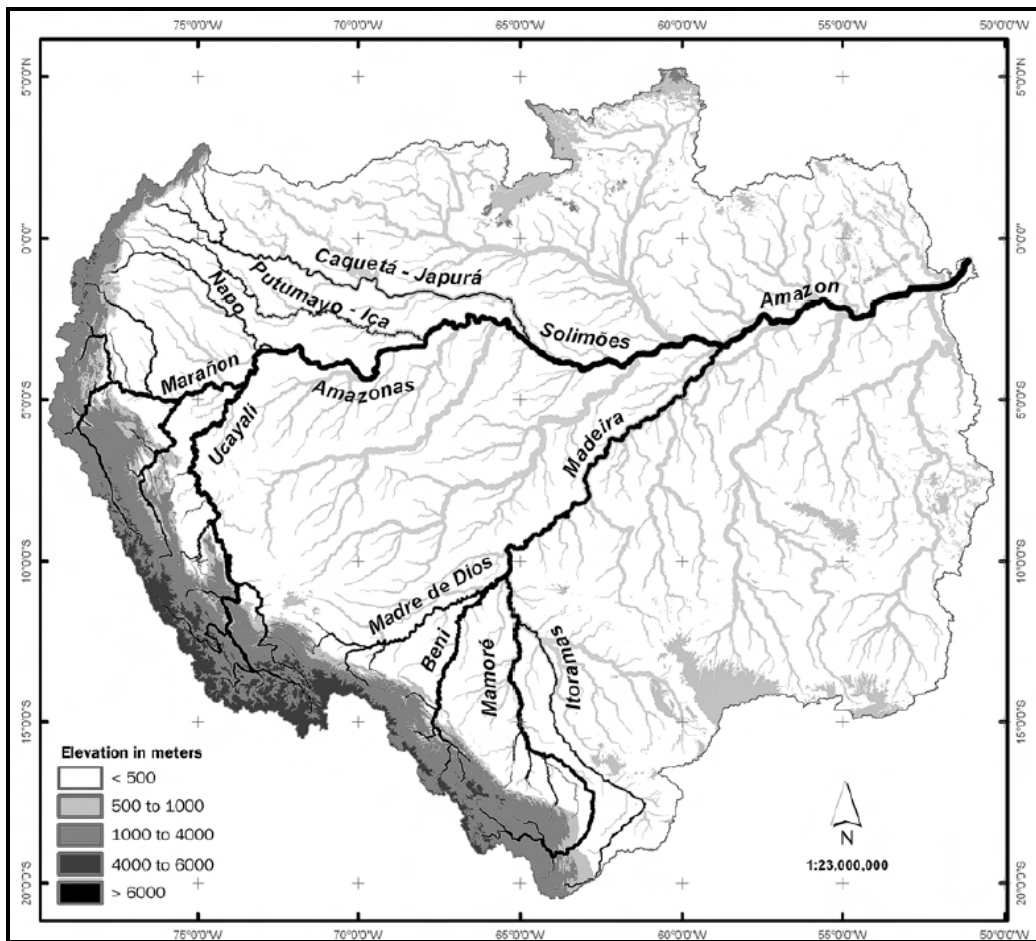


Fig. 13. Curso de los nueve principales ríos de la cuenca amazónica en Ecuador, Perú y Bolivia.

En la frontera con la zona Subandina se encuentra una amplia planicie originada por la acumulación de cientos de metros de sedimentos finos.

Si consideramos factores climatológicos, las llanuras pueden dividirse en dos grandes unidades: las llanuras húmedas inundables del Norte o Llanos del Beni y las llanuras secas del Sur o Llanos del Chaco.

1.1.3.1.1 Llanos del Beni

Debido a la casi horizontalidad del terreno, la planicie de los Llanos del Beni es rica en meandros y lagos en forma de media luna, producto de los desbordes de los ríos Madre de Dios, Beni y Mamoré. Casi toda el área está sujeta a fuertes inundaciones en la estación lluviosa. El ecosistema predominante es la sabana, pero pueden observarse algunas elevaciones del terreno a manera de islas donde se concentra la vegetación arbórea. (E.B.B. 1991)



Fig. 14 Meandros cerca de la ciudad de Trinidad Departamento del Beni. Fot. Shir Goldberg

En la época de lluvias la cuenca no puede absorber todo el volumen de agua que desemboca en ella, los ríos principales se saturan en su capacidad y el agua de los afluentes menores retrocede e inunda las llanuras adyacentes. La horizontalidad del terreno, impide la canalización y la naturaleza impermeable de la superficie evita la penetración de las aguas al subsuelo, determinando que extensas porciones de los Llanos queden anegadas.

Los suelos de los Llanos benianos están formados por sedimentos de arcillas y limos cuaternarios compuestos por silicatos de aluminio desprovistos de elementos solubles que son transportados por corrientes de agua de inundación a velocidades inferiores al Km/h (Zeitum, 1991). La estructura de los suelos impide la retención de agua y ocasiona la muerte de la mayor parte de las plantas en la época seca, por otro lado la acidez de los suelos con un $\text{pH} = 4.5-5.5$ impide la germinación de los cereales a excepción del arroz. Los valores de fósforo están en niveles de 10 a 20 veces por debajo de los mínimos, siendo únicamente la concentración de magnesio inusualmente alta.

De la superficie de esta inmensa zona inundable emergen unos montículos de escasa altura cubiertos de bosque, llamados "islas de monte" o "bosques isla" que son los lugares escogidos para la construcción de viviendas, a salvo de las aguas de inundación.

Muy pocas especies vegetales terrestres están adaptadas a estas condiciones extremas. La mayor parte de los Llanos están cubiertos de una sabana herbácea, quedando la

vegetación arbórea limitada a los bosques de galería, junto a los ríos, a los bosques isla ya mencionados y a algunas zonas con alturas libres de inundación.

La explotación de ésta sabana herbácea como pasto para ganado vacuno es la base económica actual de la región. El escaso valor nutritivo de los suelos condiciona unos rendimientos muy bajos (11 kg de carne por hectárea y por año).

La quema anual de pastos para hacerlos retoñar, la apertura de nuevos caminos y la constante creación de vías de comunicación contribuye de forma decisiva a la degradación del medio natural, ya de por sí muy pobre. (Killeen et al. 2008)

A la destrucción de la fauna terrestre se añade una fuerte contaminación de las aguas por cenizas provenientes de las quemadas anuales de pastos, que ocasiona una fuerte mortalidad de la fauna acuática.

La sabana o pampa mojeña, una de las más extensas de América del Sur, con alternancia periódica de inundaciones y sequías, suelos impermeables y una vegetación herbácea con pocos árboles, hace que todas las formas de vida que la habitan se enfrenten con el problema de alternar periodos de sobreabundancia de agua con periodos de escasez de agua. La adaptación humana a estas condiciones se ha basado históricamente en concentrar la mayor parte de las actividades en terrenos elevados en las cercanías de cursos de agua permanente.

La mayoría de los suelos de cuenca del Mamoré y del Beni, son de muy baja fertilidad, por lo que su uso agrícola se ha demostrado inviable o poco productivo, de esta manera la mayor parte de los ecólogos y etnólogos creían hasta hace unos años que la baja productividad de los suelos tropicales había impedido la formación de núcleos humanos importantes y por tanto, de sociedades complejas.

La altura de los Llanos oscila entre 270 m al sur y 180 m al norte, con un gradiente aproximado de 20 cm por kilómetro. Los Llanos son casi planos, con muy pocas manifestaciones de relieve superior a los dos o tres metros de altura.



Fig. 15 Llanura beniana. Fot. Andoni Canela

Los terrenos más bajos, por lo general antiguos atajos de meandros (curiches), pueden guardar agua superficial durante la mayor parte del año, mientras que las depresiones un poco más altas o mejor drenadas (bajíos) sólo están inundadas estacionalmente. Los terrenos con elevaciones de más de un metro raramente se inundan o sólo lo hacen por un breve espacio de tiempo; normalmente presentan vegetación arbórea y por lo general se componen de vertientes bajas y de restos de malecones naturales. Los terrenos con elevaciones de dos o tres metros de altura incluyen lomas (pequeñas colinas) artificiales, y crestones en forma de escudo a lo largo de los márgenes de la cuenca. De la superficie cartografiada de los Llanos de Moxos, alrededor del 80% (unos 145.000 Km²) forman sabana, y el resto constituyen las galerías e islas con arbolado.

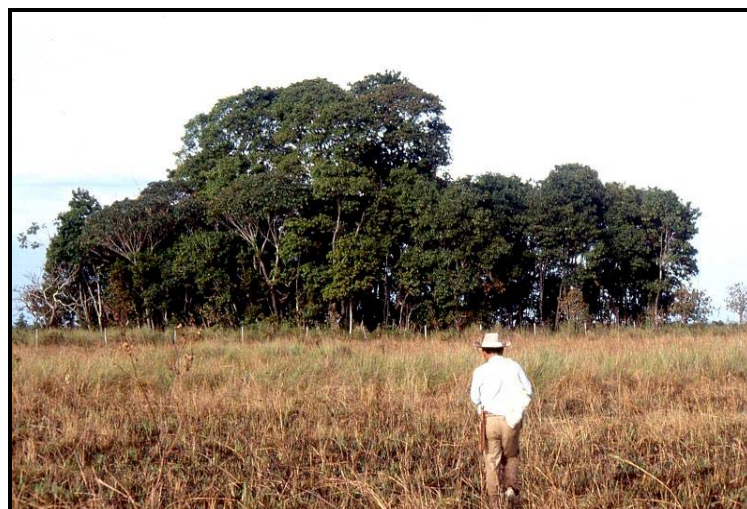


Fig. 16 Isla bosque en los Llanos de Moxos. Departamento del Beni. Fot. Francesc Bert

En la cuenca del Beni hay varios centenares de lagos permanentes; la mayoría se encuentran en los Llanos y sus dimensiones alcanzan hasta un máximo de 520 Km². La mayoría de ellos son muy someros, carecen de bocas de entrada y de desagüe, aparentando un origen reciente. Almacenan agua fresca buena parte del año y se alimentan principalmente de las precipitaciones.

Los lagos de Moxos son de gran importancia para la población humana, los animales salvajes y el ganado; constituyen una fuente de agua durante la estación seca cuando llegan a secarse la mayoría de las pequeñas corrientes.



Fig. 17 Laguna Normandía en el Departamento del Beni.



Fig. 18 Llanos de Moxos durante la estación seca. Fot. Francesc Bert



Fig. 19 Llanos de Moxos en la estación húmeda. Fot. Francesc Bert

El estudio de los restos prehistóricos en Moxos, ha evidenciado que hubo culturas amazónicas que dominaron técnicas productivas basadas en la explotación de la fertilidad de las aguas blancas.

La existencia de este potencial cultural y ecológico que se ha bautizado como limnocultura ha obligado a que se revisen algunos de los dogmas sobre la historia amazónica de Bolivia (Barba, 2003).

1.1.3.1.2 Llanos del Chaco

Al Sur del paralelo 16° se extiende la llanura del Chaco, cuyo paisaje y vegetación responden a un clima tropical seco. Los ríos son poco frecuentes y sus aguas se infiltran en arenales del subsuelo.



Fig. 20 Llanuras del Chaco donde la actividad ganadera es importante. Fot. Willy Kennig

1.1.3.2 El Escudo Brasileño

A lo largo de la frontera con Brasil existe una zona con afloramientos de rocas precámbricas, principalmente granitos y basaltos designada como Escudo Brasileño. La superficie que aflora en forma de serranías y mesetas tiene una extensión aproximada de 230.000 Km².

La afloración más occidental del Escudo en el Departamento del Beni se encuentra a pocos kilómetros de la localidad de Magdalena cerca del río Orobayaya. A partir de este punto el Escudo Precámbrico se sumerge bajo la masa sedimentaria cuaternaria. La profundidad del Escudo en el Piedemonte es de unos 600 metros.

Bajo la cubierta del altiplano, el Escudo fue detectado a profundidades superiores a un kilómetro (E.B.B. 1991).

1.1.3.3 Las Serranías Chiquitanas

En la provincia de Chiquitos del Departamento de Santa Cruz existe una zona más elevada que el resto circundante de planicies, que recibe el nombre de Sierras Chiquitanas. Son cadenas bajas de montañas que forman hileras paralelas.

Esta unidad se formó por el plegamiento de materiales terciarios impelidos cuando la Cordillera Andina cambió de rumbo al encontrar el Escudo Precámbrico (E.B.B. 1991).



Fig. 21 Serranías Chiquitanas

1.2. Estacionalidad climática en el Beni

La cuenca del Beni ubicada entre los 11° y los 17° de latitud Sur, tiene un clima tropical de inviernos secos (clima “Aw” según la clasificación de Köppen), a excepción de la zona de bosques lluviosos situados a los pies de los Andes en los que hay una fuerte precipitación durante todo el año (clima “Af”). En los Llanos de Moxos las precipitaciones oscilan entre 1500 mm y 1800 mm anuales. La estación seca, que corresponde a los meses con menos de 60 mm de precipitación, tiene una duración de cuatro a cinco meses (de mayo a septiembre). Los meses con precipitaciones más intensas son diciembre, enero, febrero y marzo; los meses más secos corresponden a junio, julio y agosto. La duración de la estación húmeda aumenta hacia los Andes (once meses en San Borja y Rurrenabaque), y disminuye hacia el sudeste (cinco meses en Ascensión), el régimen de precipitaciones hace de los Llanos de Moxos una de las mayores áreas de inundación del planeta.

Un rasgo característico de los trópicos, es que la precipitación varía considerablemente de un año a otro, y de un lugar a otro durante el mismo año y dentro de la misma zona. Los años de mayor precipitación no corresponden necesariamente con los años de mayor inundación.

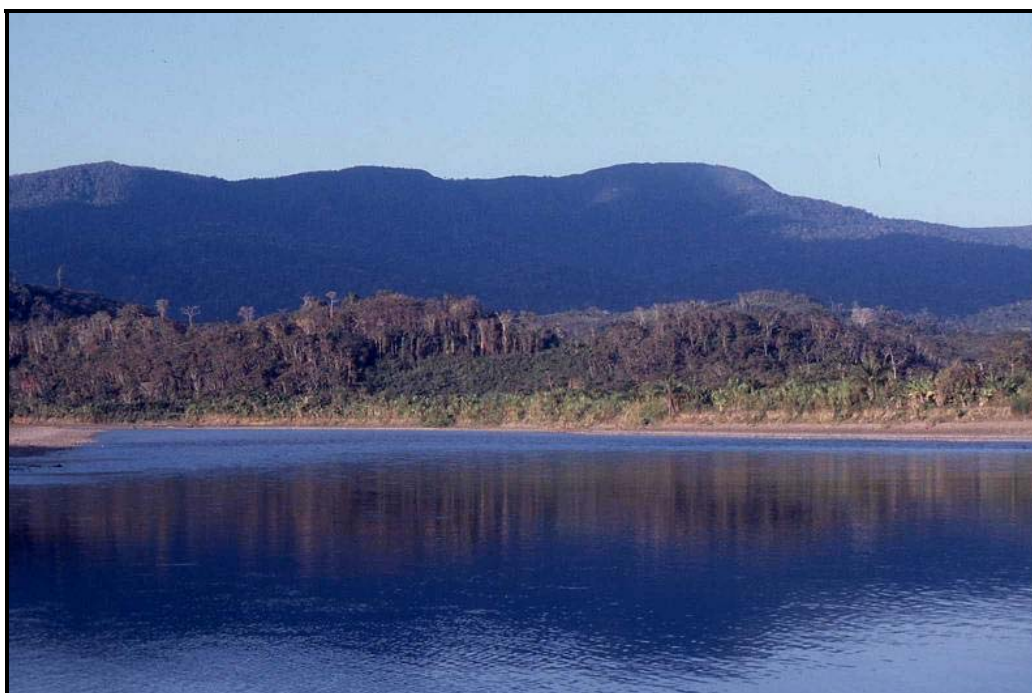


Fig. 22 El río Beni durante la estación de lluvias. Fot. Francesc Bert

El período de inundación de los Llanos presenta un retraso de unos dos meses con respecto a la estación lluviosa. La inundación comienza a finales de diciembre, llega a su punto culminante en febrero, empieza a retroceder en marzo y finaliza en junio.

Probablemente alrededor de unos 100.000 Km² quedan normalmente anegados en la época de máxima inundación. La altura de la inundación varía desde unos pocos centímetros hasta 1,5 - 1,8 metros; pero parece que el promedio se encuentra entre 0,30 y 0,60 metros durante la mayor parte del período de inundación. A partir de los meses de junio y julio, la sabana puede secarse rápidamente y el nivel del agua en los ríos y arroyos puede descender varios decímetros en pocos días.

En los meses siguientes sólo los grandes ríos mantienen un flujo de agua. En los bajíos y curiches el agua va evaporándose, llegando a secarse totalmente, hasta llegar a octubre y noviembre cuando empieza de nuevo la época húmeda (Barba et al. 2003).

En resumen, la estación de verano (octubre-abril) es húmeda y calurosa, mientras que el invierno (mayo-septiembre) es seco y cálido. Esporádicamente, durante la estación seca penetran frentes fríos “surazos” procedentes de zonas subpolares antárticas, provocando bajadas bruscas de temperatura, fuertes vientos, y a veces lluvia. Sólo alguna vez los surazos comportan temperaturas inferiores a los 10° C (Montes de Oca, 2001).

1.3 Antecedentes históricos de Los Llanos de Moxos

Los habitantes del Beni están acostumbrados a encontrar evidencias del poblamiento antiguo de su Departamento, con frecuencia hallan restos humanos antiguos que constatan que la región fue densamente habitada por una población que enterraba a sus muertos en las lomas o "islas de monte", población a la que llaman los "antiguos cambas" o "gentiles".

Estas lomas, que se cuentan por miles, son hoy los lugares que se escogen para edificar, ya que quedan por encima del nivel máximo de las aguas en la época de inundación. La erosión pone continuamente al descubierto restos humanos y de cerámica, que en algunos casos es reutilizada de nuevo (Calandra y Salzedo, 2004).

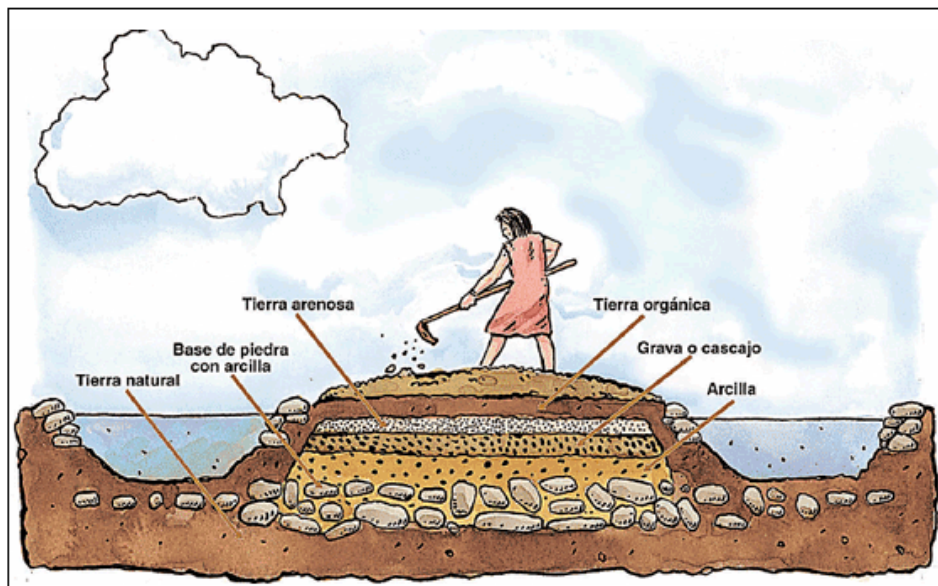


Fig. 23. Representación de la estructura de los camellones donde se aprecia el uso de diferentes materiales sedimentarios para su construcción.

Cuando los españoles llegaron a América, recogieron multitud de testimonios orales de la gran riqueza que tenía la zona de Moxos entre sus vecinos guaraníes, quechuas y chiquitanos, y que recibía los nombres de Paitití, Moxos, Candire o Tierra Rica (Kupchik, 2008). La crónica de Garcilaso el Inca (Aranibar, 1991) la sitúa con gran acierto "a cien leguas al este de Cuzco". Esta fama motivó una serie de intentos de conquista que partieron del Altiplano o de la cuenca del Plata: A la primera expedición, efectuada en 1539 le siguieron más de veinte, todas ellas bien documentadas y que acabaron con idéntico fracaso.

Las crónicas de estos intentos de conquista, y los testimonios de algunos clérigos solitarios, nos describen un país rico, próspero, densamente poblado, con aglomeraciones urbanas de tamaño regular y con excedentes alimentarios durante todo el año. En algunos casos manifiestan su asombro por unas calzadas bien cuidadas y limpias que comparan con ventaja con los caminos de España.

Moxos permaneció por más de un siglo como una tierra incógnita de la que llegaban noticias contradictorias y cuya fama fue disminuyendo con el tiempo. Fue en 1676 cuando se creó el primer asentamiento español en los Llanos orientales, un grupo de tres jesuitas fundaron una Reducción en el pueblo de Baures. Los testimonios que llegaron sobre los baures eran en extremo elogiosos, gente civilizada, con estructuras sociales complejas, un urbanismo ejemplar y una artesanía de una calidad que competía con la española. A pesar de ello, era una población escasa, pobre y enfermiza.

Moxos había sido definido por la Corona española, como las tierras desconocidas al norte de Santa Cruz, un territorio del que se desconocían sus fronteras pero que se suponía que lindaban con el mar. Este territorio fue concedido a los jesuitas para que lo administraran en forma de reducciones, como lo venían haciendo en amplias zonas de Paraguay.

Durante cien años, y hasta su expulsión, los jesuitas fueron los únicos testigos de la vida en estos territorios, cuyo acceso se negaba al resto de españoles. La documentación legada por ellos, en parte desaparecida y la existente muy dispersa, es una valiosa fuente de información que no ha sido suficientemente explotada.

La introducción del hierro y del ganado vacuno contribuyó a un cambio en el modo de producción indígena, que perdió su autonomía y fue sometido a una intensa colonización religiosa.



Fig. 24 Danza de los macheteros en las fiestas de San Ignacio en San Ignacio de Moxos en el pasado: (Mercado, Melchor María. La Plata - 1871, Sucre: Álbum de paisajes, tipos humanos y costumbres de Bolivia, 1841-1869) y en la actualidad. Fot. Francesc Bert

La expulsión de los jesuitas en 1768 supuso graves consecuencias para los indígenas, los cuales fueron sometidos a una nueva clase de clérigos que los subordinaron a una dominación particularmente cruel. Esta situación fue denunciada duramente por el gobernador Lázaro de Ribera en su informe sobre Moxos (1786-1794).

Moxos, bautizado después como Departamento del Beni, quedó al igual que el resto del Oriente boliviano como un país remoto y poco conocido, con una economía precaria que tuvo algunos momentos de fiebre económica con la quinina, el caucho o la coca.

1.4 Antecedentes históricos del Piedemonte

El Piedemonte central andino estuvo habitado durante la época prehispánica por una gran diversidad de grupos humanos a los que los primeros europeos denominaron *chunchos*, estas poblaciones han sido definidas como tribus de culturas de bosque tropical con influencias tanto amazónicas como andinas. (Steward 1948).

Los contactos interregionales en la región del Piedemonte con los Andes Orientales están bien descritos. Se sabe que la cultura Kallawaya (900–1300 bp) que precedió la cultura Inca, realizaba numerosos intercambios con las tribus del Piedemonte (Moseley, 1993). Para éste autor existían cuatro estratos productivos verticales en la cultura Kallawaya:

- Las cumbres andinas glaciares que suministraban agua durante todo el año.
- La Punas o pastos húmedos de gran altura que permitía la alimentación de los rebaños de camélidos.
- Los valles templados que eran utilizados como zonas de cultivo de tubérculos y cereales.
- Las Yungas semitropicales donde se cultivaban productos frutales.

El Piedemonte está situado inmediatamente a continuación de las Yungas y actuaba como una zona de mercado o de intercambio donde sus habitantes, facilitaban a los andinos plantas medicinales, tintes y otros elementos imprescindibles para las ceremonias andinas (Saignes 1985, Meyers 2002). Por otro lado, la población andina facilitaba productos de los distintos estratos andinos a los chunchos.

Desde un punto de vista de la etnohistoria demográfica, Meyers (2002) señala que las interacciones entre las poblaciones de pastores-agricultores de las tierras altas y las poblaciones de cazadores-recolectores y agricultores del Piedemonte acabó con un proceso de etnogénesis que culminó con la aparición de la cultura Kallawaya ya mencionada.

Con la aparición de la esfera cultural Kallawaya, diversos grupos del Piedemonte fueron asimilados bajo este techo cultural de forma pacífica y siempre bajo criterios de intercambio de bienes, formando un *continuum* que abarcaría una buena parte de la faja subandina de Bolivia. Por otra parte, algunos autores entre los que se hallan Núñez y Dillehay 1995 consideran que la cultura Tiwanaku (500-1200 AC) fue el producto de la convergencia de fuerzas económicas en un mosaico de “movimientos humanos giratorios” entre las tierras altas andinas y las tierras bajas amazónicas. Los motivos zoomorfos de decoración de Tiwanaku, las referencias a animales típicamente amazónicos o la presencia de tintes, añadido al idioma pukina que hablaba la nobleza andina y que es de origen arawak; apunta a una clara influencia de la cultura amazónica en la región andina (Torero 1974).

Con la llegada del Imperio Inca, las rutas de intercambio entre la zona andina y amazónica de la cultura Kallawaya fueron vitales en la expansión de los Incas para anexionar las tierras bajas, echo que nunca se acabó produciendo con éxito.

El intercambio del Piedemonte con los Incas se basó en el cultivo de la planta de la coca y metales preciosos. Los Incas instalaron en la región *mitmaqunas* o colonias incas de otras regiones del imperio. Se inició un nuevo proceso de etnogénesis que esta vez utilizó la lengua y la cultura Quechua como factor centralizador. (Sánchez Canedo, 2008)

La llegada de los colonos españoles desarticuló todas las interacciones que se habían creado y fortalecido durante siglos entre el área andina y la amazónica quedando ambas regiones separadas culturalmente.

1.5 La población Amerindia de Sudamérica y Bolivia

1.5.1 La situación de la población Amerindia en Centro y Sudamérica

Se estima que la población amerindia del Centro y Sudamérica es de aproximadamente unos 51 millones de personas (Lizcano Fernández 2005). Si nos limitamos a Sudamérica, el 91% de la población amerindia se concentra en Ecuador, Perú y Bolivia.

Salzano et al. 1988, caracteriza a todas éstas poblaciones autóctonas por un denominador común resumido por los puntos siguientes:

- Relativa homogeneidad genética debido a que las rutas de entrada al continente americano proveniente de Asia fueron muy limitadas y reducidas.
- Existencia de gradientes de diferenciación morfológica y genética debidos a un aislamiento geográfico y cultural.
- Presencia de polimorfismos excluyentes debidos a una estructura poblacional basada en mecanismos de fusión-fisión.
- Pérdida de identidad genética y despoblamiento debido procesos de aculturación y mestizaje.

1.5.2 La población Amerindia en Bolivia

En Bolivia la comunidad indígena se aproxima a los 5.500.000 individuos y constituye la mayor parte de la población; el porcentaje respecto del total de la población oscila según los autores entre el 60% (Rance, 1992) y el 67% (INE, 2001) .

Los Aymarás y Quechuas ubicados en la zona andina del país son los grupos mayoritarios, mientras que en las zonas orientales y amazónicas, las poblaciones mayoritarias son las Guaraní, Chiquitana y Moxo.

Aparte de éstas poblaciones mayoritarias, existen otras 30 etnias que constituyen un 2,5% de la población total. La densidad de población del Departamento del Beni es de 1.2 habitantes por km².

La composición étnica de la población del Beni refleja la diversidad de culturas existente en la zona: el grupo principal es el mojeño, de la familia arawak; las otras etnias predominantes son Yuracarés y Canichanas, del grupo Chapacura; Chimanes y Mosevenes,

del grupo Pano-Tacana; Sirionó, del grupo Tupí-Guaraní; e Itonamas, es importante recalcar que en la zona se han clasificado 16 grupos lingüísticos. (CIDDEBENI, 1990) y que en los últimos cien años, el número de etnias indígenas se ha reducido a la mitad.

Actualmente existe una gran presión demográfica desde el Altiplano hacia la Amazonía, que va en aumento, en algunos lugares del Oriente boliviano, la población “colla” (Aymará y Quechua) llega al 30%. Santa Cruz de la Sierra es uno de los lugares que recogen mayoritariamente este flujo migratorio (Urioste, 2005)

La actividad económica de las etnias indígenas se basa en la agricultura de subsistencia, que no llega a producir excedentes para su comercialización en los mercados de las ciudades. El principal cultivo es el arroz, prácticamente el único cereal que se adapta a los suelos ácidos característicos del área. La producción familiar se basa en la explotación de "chacos", pequeñas parcelas de 1 a 2 hectáreas, frecuentemente ganadas al bosque, por el sistema de roza y quemazón, y que se abandonan después de varios años de producción debido al agotamiento de los nutrientes de los suelos. (Chichón, 1992)

La actividad productiva de la zona se basa exclusivamente en una ganadería extensiva cuya rentabilidad, debido al valor nutritivo exiguo de los pastos, precisa de una superficie de 10.000 a 50.000 hectáreas con una importante inversión de capital, y se encuentra en manos de grandes propietarios, con frecuencia absentistas. Dicha actividad no genera empleo estable en la zona, sólo a escala temporal, y su producción se comercializa directamente a las ciudades a través de aviones fletados por los ganaderos.

La distribución geográfica de los pueblos indígenas de Bolivia abarca las tres grandes cuencas hidrográficas del país (Censo Nacional 2001). En la del Amazonas, que está subdividida a su vez en las regiones de Precordillera, Selva del Noreste, Pampas Benianas y Selva Oriental, se encuentran la mayor parte de los pueblos indígenas (Departamentos de Pando, Beni, Santa Cruz, norte de La Paz y región del Trópico de Cochabamba), en la cuenca del Plata (Departamentos de Tarija, Potosí y Chuquisaca Sur) conformada por los ríos Pilcomayo y Bermejo se encuentran los Weenhayek o Mataco, Tapiete y parte de los Guaraní. Finalmente, en la cuenca lacustre endorreica conformada por el eje acuático que une a los Lagos Titicaca y Poopó, entre las Cordilleras Oriental y Occidental se encuentran los Aymará y Uru (Chipaya, Murato e Iru Itu). La población Quechua se encuentra principalmente en la región de los Valles interandinos, que comprenden parte de los Departamentos de Cochabamba, Chuquisaca, Tarija, parte de La Paz y Potosí.

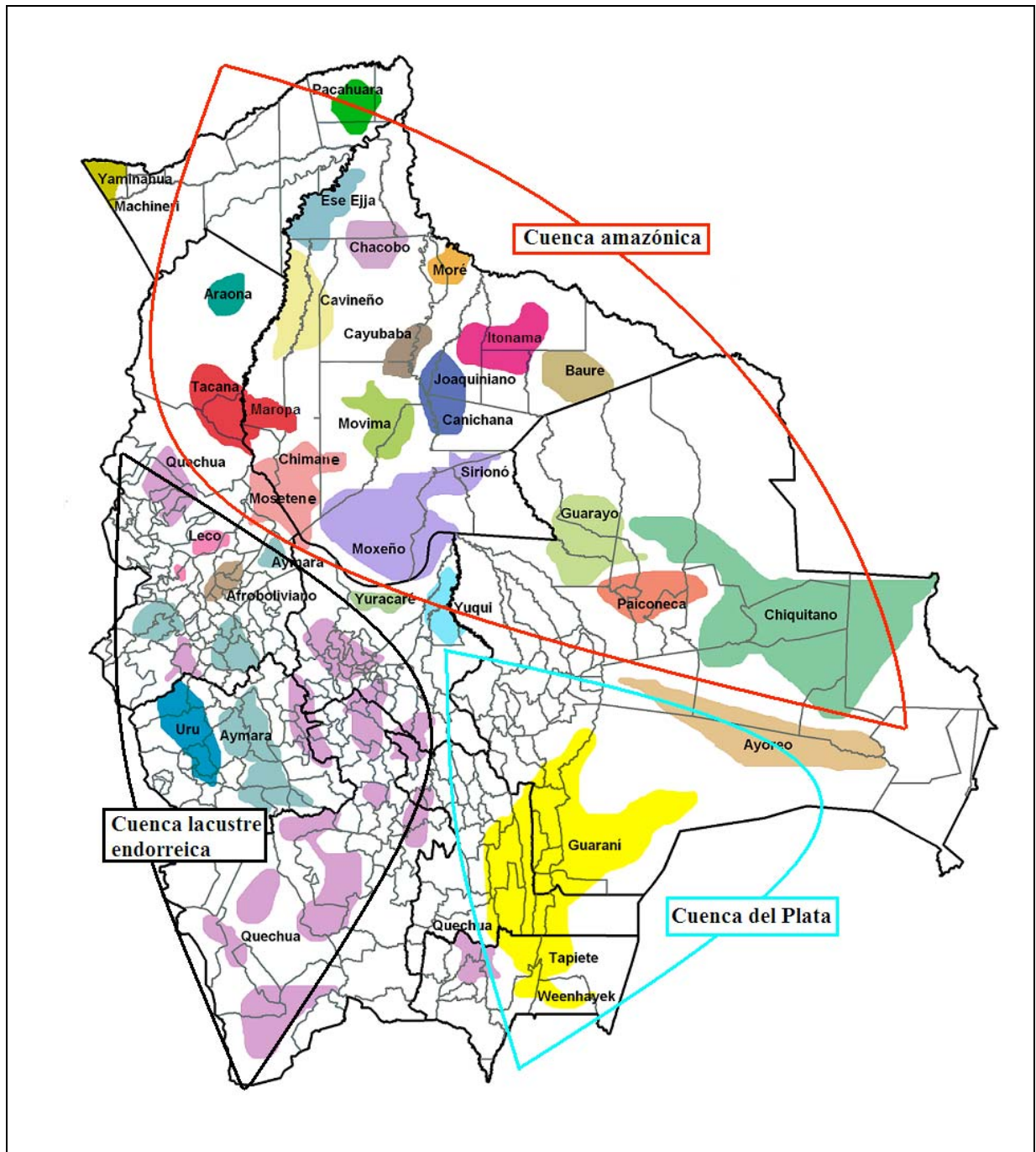


Fig. 25 Etnias de Bolivia según las principales cuencas del país.

ASPECTOS BIODEMOGRÁFICOS DE GRUPOS ÉTNICOS MACRO-PANO DE BOLIVIA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES AYMARÁ, QUECHUA, CHIMANE Y MOSETÉN

Pueblo indígena	Departamento	Provincia	Lengua
Aymará Quechua Guaraní	Chuquisaca	Hernando Siles Luis Calvo	Andino Andino Tupi Guaraní
Leco Iru Ito (Uru Chipaya) Araona Tacana Esse Ejja Mosetén Aymará	La Paz	Larecaja Franz Tamayo Ingavi Abel Iturralde Abel Iturralde Abel Iturralde Sur Yungas	Aislada Uru Chipaya Tacana Tacana Tacana Mosetén Andino
Aymará Quechua Yuracaré Yuki	Cochabamba	Chapare Carrasco	Andino Aislada Tupi Guaraní
Quechua Aymará Chipaya	Oruro	Atahuallpa	Andino Andino Uru Chipaya
Aymará Quechua	Potosí		Andino Andino
Mataco (Weenhayek) Tapiete	Tarija	Gran Chaco	Mataco Maka Tupi Guaraní
Guarasuwe Ayoreo Ava Isozeño Chiquitano Guarayu Sirionó	Santa Cruz	Velasco Chiquitos Ñuflo de Chávez Ángel Sandóval Germán Bush Cordillera Ñuflo de Chávez Guarayos Guarayos	Tupi Guaraní Zamuco Tupi Guaraní Aislada Tupi Guaraní Tupi Guaraní

Pueblo indígena	Departamento	Provincia	Lengua	
Sirionó	Beni	Cercado	Tupi Guaraní	
Chácobo		Vaca Díez	Pano	
Pacahuara		Vaca Díez	Pano	
Esse Ejja		Vaca Díez	Tacana	
Cavineña		Gral. José Ballivián	Tacana	
Mosetén		Gral. José Ballivián	Moseten	
Chimane		Gral. José Ballivián	Moseten	
		Moxos	Moseten	
Cayubaba		Yacuma	Aislada	
Movima		Yacuma	Aislada	
Ignaciano		Moxos	Arawak	
Yuracaré		Moxos	Aislada	
Canichana		Mamoré	Aislada	
Itonama		Iténez	Aislada	
Moré		Mamoré	Chapacura	
Trinitario		Marbán	Arawak	
Baure		Iténez	Arawak	
Essse-Ejja		Pando	Madre de Dios	Tacana
Yaminahua			Nicolás Suárez	Pano

Tabla 2 Pueblos indígenas de Bolivia por Departamento, provincia y afiliación lingüística. Según Censo nacional 2001.

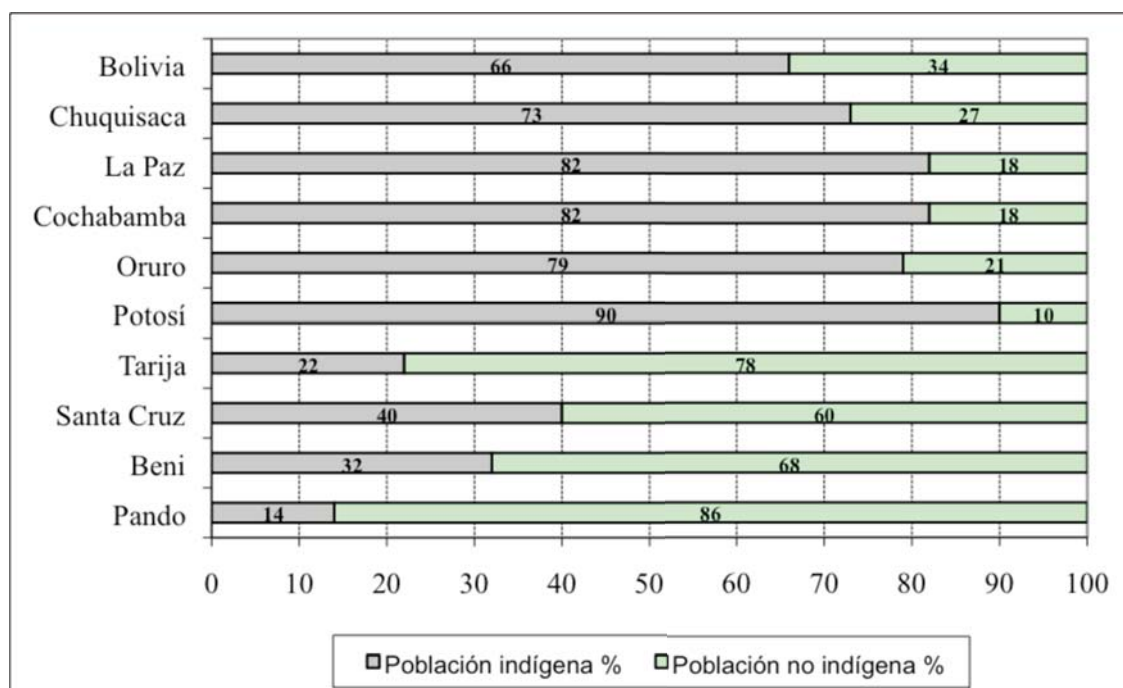


Tabla 3. Tanto por ciento de población indígena y no indígena por Departamento. Censo Nacional 2001

Las poblaciones indígenas más numerosas (Quechuas y Aymaras) se concentran principalmente en el Occidente del país mientras que los otros pueblos se encuentran ubicados predominantemente en los Departamentos orientales.

La población Quechua alcanza un total de 2.530.985 personas y se concentra en una mayor proporción en el Departamento de Cochabamba (37,9%), en segundo lugar en el Departamento de Potosí con 21,5%, en tercer lugar en Santa Cruz con 13,2% y posteriormente en el Departamento de Chuquisaca con 12,8%.

No deja de ser interesante la importante presencia de Quechuas en el Departamento de Santa Cruz, debida a la fuerte corriente migratoria que se ha producido hacia el Oriente en los últimos años. Con respecto al total de indígenas del Departamento, esta población es la de mayor peso relativo, le siguen los Chiquitanos y los Guaraníes, siendo estos últimos, la población originaria de este territorio.

Los indígenas pertenecientes al pueblo Aymará se concentran en una gran mayoría (80,2%) en el Departamento de La Paz y en segundo lugar el Departamento de Oruro (7,3%) y Cochabamba (5,1%) en tercer lugar.

1.6 Biodemografía

A partir del Censo Nacional de 2001, elaborado por la Comisión Económica para América Latina (CEPAL) por las Naciones Unidas y el Banco Interamericano de Desarrollo (BID) en el que se estudiaron algunos de parámetros biodemográficos de las poblaciones indígenas de Bolivia, se ha elaborado el siguiente apartado.

En la tabla 4 se presenta la población de cada uno de los pueblos indígenas obtenida a partir de la pregunta sobre auto pertenencia a un grupo indígena u originario en la población de 15 y más años de edad.

Pueblos originarios o indígenas	Total			Área Urbana			Área Rural	
	Total	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer	Total	Hombre
Quechua	1 510 560	716 032	794 528	763 312	348 479	414 833	747 248	367 553
Aymara	1 243 728	605 658	638 070	737 604	350 790	386 814	506 124	254 868
Guarani *	77 121	39 546	37 575	43 728	21 972	21 756	33 393	17 574
Chiquitano **	108 206	56 146	52 060	74 353	37 057	37 296	33 853	19 089
Moxeño***	44 247	23 390	20 857	32 641	16 555	16 086	11 606	6 835
Araona	90	52	38	19	13	6	71	39
Ayoreo	798	407	391	142	59	83	656	348
Baure	475	276	199	152	83	69	323	193
Canichana	208	124	84	93	51	42	115	73
Cavineño	836	452	384	64	35	29	772	417
Cayubaba	326	195	131	66	39	27	260	156
Chácobo	247	127	120	43	24	19	204	103
Chimán, Tsimane	4 126	2 136	1 990	863	441	422	3 263	1 695
Ese-ejja, Chama	396	206	190	112	63	49	284	143
Guarasugwe	9	5	4	0	0	0	9	5
Guarayo	5 904	2 921	2 983	3 856	1 820	2 036	2 048	1 101
Ironama	1 416	775	641	613	301	312	803	474
Josquiniano	160	80	80	78	34	44	82	46
Leco	2 296	1 223	1 073	652	324	328	1 644	899
Machineri Yine	15	8	7	2	1	1	13	7
Moré	43	21	22	8	4	4	35	17
Moserén	789	432	357	83	41	42	706	391
Movina	6 008	3 193	2 815	3 178	1 503	1 675	2 830	1 690
Pacahuara	31	20	11	25	17	8	6	3
Reyesano, Maropa	2 717	1 467	1 250	1 688	841	847	1 029	626
Sirionó	133	72	61	20	13	7	113	59
Tacana	3 452	1 922	1 530	977	510	467	2 475	1 412
Tapieté	18	12	6	0	0	0	18	12
Urus ****	1 190	664	526	190	135	55	1 000	529
Weenhayek, Mataco	973	487	486	352	178	174	621	309
Yaminawa	41	21	20	16	8	8	25	13
Yuki	112	63	49	19	15	4	93	48
Yurakaré	1 366	728	638	53	33	20	1 313	695
Sin especificar	32 691	17 370	15 321	23 074	12 045	11 029	9 617	5 325
A ninguno de los Pueblos Indígenas	1 864 517	888 190	976 327	1 482 848	684 975	797 873	381 669	203 215
TOTAL	4 915 245	2 364 421	2 550 824	3 170 924	1 478 459	1 692 465	1 744 321	885 962

Fuente: Elaboración propia en base a los resultados del Censo 2001. La Paz - Bolivia, 2004.

* Guarani (Ava, Izocéño, Simba)
** Chiquitano (Besiro, Napeca, Paunaca, Moncoca)
*** Moxeño (Trinitario, Javeriano, Loretano, Ignaciano)
**** Urus (Uru-chipaya, Murato, Uruito)

Tabla 4 Valores absolutos de población indígena por área rural o urbana.

El censo se realizó sobre un total de 5.358.681 habitantes, sobre este total, la población de 15 o más años que respondió a la pregunta de auto identificación a algún grupo étnico alcanzó 4.915.245 habitantes. De la población que dijo pertenecer a algún pueblo indígena, el más representativo fue el Quechua con el 50%, le siguió en orden de importancia el Aymará con el 41,2%, el Chiquitano con el 3,6%, el Guaraní con el 2,5% y el Mojeño con el 1,5%.

Asimismo, con respecto a los dos pueblos más numerosos, el Quechua está conformado por el 47,4% de hombres y 52,6% de mujeres, el 50,5% vive en el área urbana y 49,5% vive en el área rural; el Aymará está conformado por el 48,7% de hombres y el 51,3% de mujeres y viven el 59,3% en el área urbana y el 40,7% en el área rural.

1.6.1 Pirámides de edad

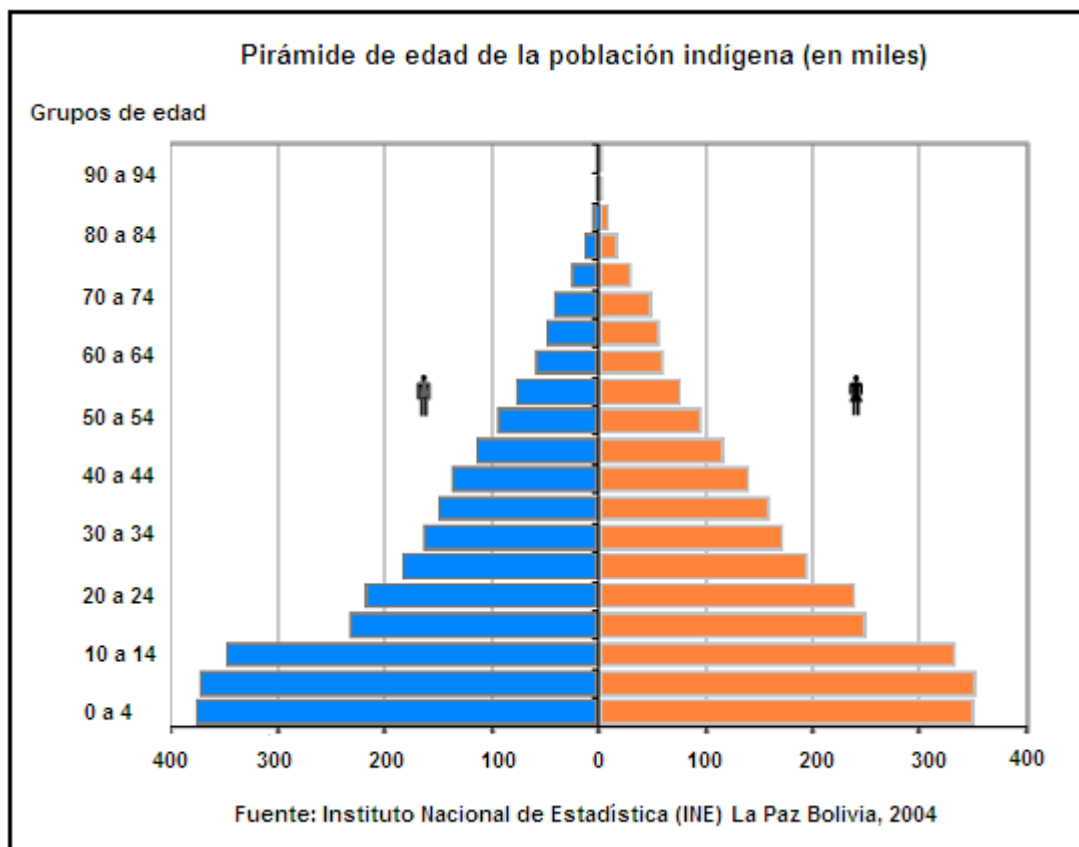


Fig. 26 Pirámide de edad de la población indígena de Bolivia.

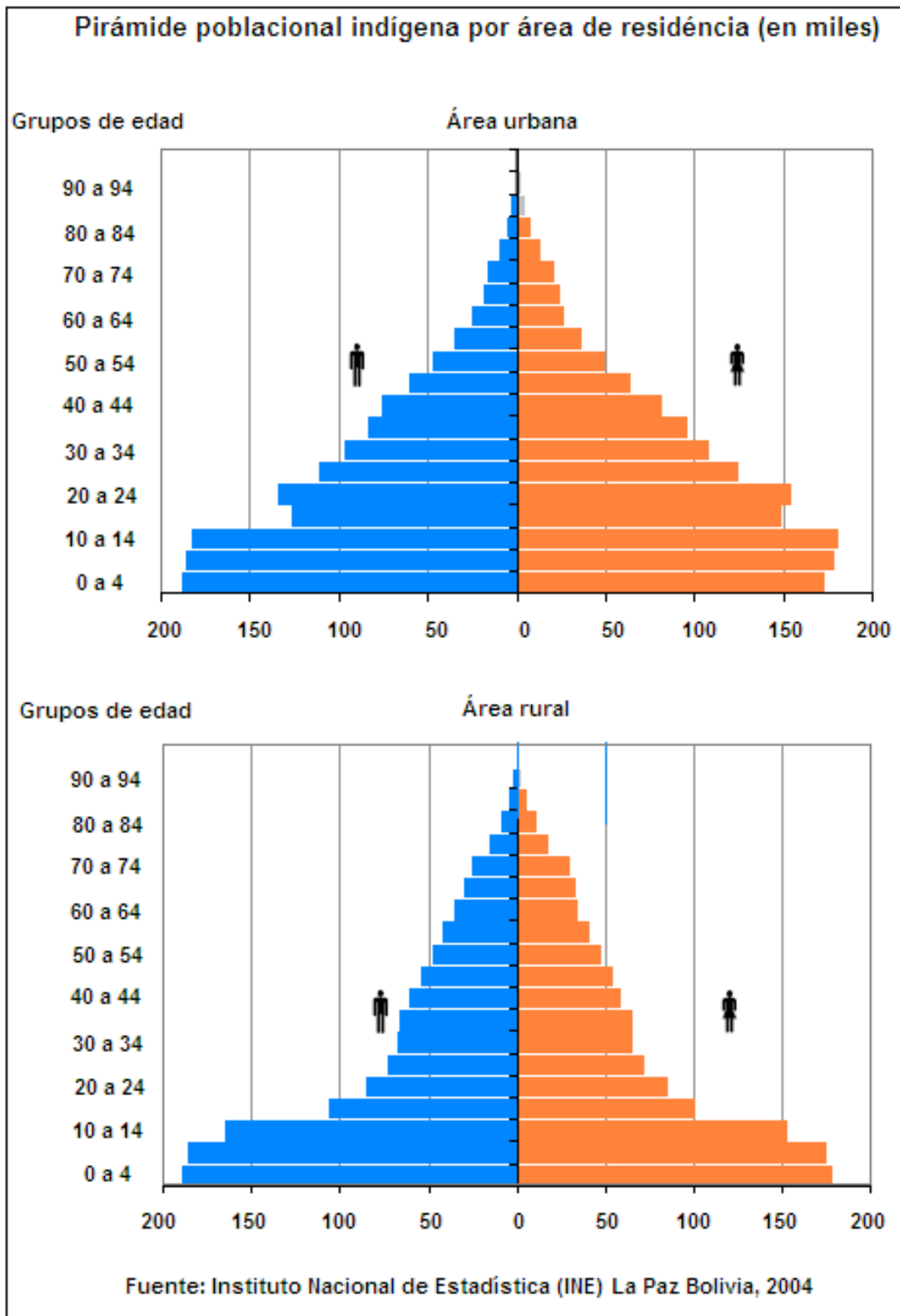


Fig. 27 Pirámides de edad de la población indígena de Bolivia según ubicación urbana y rural.

En términos generales, de un total de 5.358.681 personas pertenecientes a la condición indígena en Bolivia, la población comprendida entre 0 y 14 años representó, casi el 40%.

Específicamente el grupo de 0 a 4 años alcanzó el 13,5%, igual que el grupo de 5 a 9 años, la cohorte de 10 a 14 años el 12,7%. Por tanto, la categoría indígena obtenida según la condición étnico-lingüística presentaba todavía una base muy amplia en la pirámide, lo que implica una transición demográfica incipiente.

Considerando la pirámide de población indígena según área de residencia se observó que para las tres primeras cohortes no existe mucha diferencia entre las personas que viven en el área urbana y rural.

Donde se advierten diferencias es en las cohortes o grupos de edad productiva, ya que existe un despoblamiento en el área rural, debido a las migraciones en busca de mejores oportunidades laborales a la ciudad.

Asimismo, se advierte que a partir de las cohortes de edad de 55 y más años hay una mayor predominancia de la población indígena en el área rural, lo cual denota la falta de movilidad debido a la falta de posibilidad de inserción en el mercado laboral por la edad avanzada.

1.6.2 Estructura poblacional por sexo

En la población indígena se observa un equilibrio entre hombres y mujeres. A nivel urbano las mujeres representan el 51% y los hombres el 49%. En el área rural la relación se invierte y los hombres son el 51% y las mujeres el 49%.

La población no indígena mantiene la tendencia con una pequeña superioridad de las mujeres (51%) sobre los hombres (49%). En el área urbana se observa un pequeño incremento del porcentaje de mujeres que representan el 52% frente al 48% de los hombres, en el área rural, la relación se invierte y los hombres representan el 53% frente al 47% de mujeres.

Para examinar la estructura por sexo se suele utilizar el índice de masculinidad, que expresa el número de hombres por cada 100 mujeres, los resultados por condición etnolingüística se presentan en la tabla 5.

Desde un punto de vista nacional, se observa que las cohortes correspondientes a las edades productivas en la población indígena presentan un índice de masculinidad con un

promedio de 93 hombres por cada 100 mujeres, lo cual por un lado puede ser reflejo de un posible proceso migratorio, y por otro, podría representar un mayor porcentaje de declaración femenina en las encuestas.

También se evidencia que el área urbana presenta índices de masculinidad menores que el área rural, indicio de la selectividad por sexo de la migración. Asimismo, se advierte que la última cohorte de edad presenta un índice menor, debido a un patrón muy común de mortalidad en el cual las mujeres son en promedio más longevas.

Para el caso de la población indígena, se advierte que aquella que vive en el área urbana presenta índices de masculinidad inferiores en las edades productivas que la que vive en el área rural, especialmente la cohorte de 15 a 34 años de edad (87,7 hombres por cada 100 mujeres), debido a movimientos migratorios del campo a la ciudad en búsqueda de mejores condiciones de vida u oportunidades laborales diferentes a las actividades agropecuarias.

Para el caso de la población no indígena que vive en el área urbana, el menor índice de masculinidad se presenta para la cohorte de 35 a 49 años de edad, asociado a un patrón selectivo de migración interna femenina adulta que busca trabajo como empleadas del hogar. En tanto que la población no indígena que vive en el área rural presenta para todas las cohortes índices de masculinidad significativamente por encima de 100; este predominio masculino puede ser el resultado de una emigración intensa de mujeres o, nuevamente, a una declaración diferencial por sexo a las preguntas de origen étnico.

ASPECTOS BIODEMOGRÁFICOS DE GRUPOS ÉTNICOS MACRO-PANO DE BOLIVIA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES AYMARÁ, QUECHUA, CHIMANE Y MOSETÉN

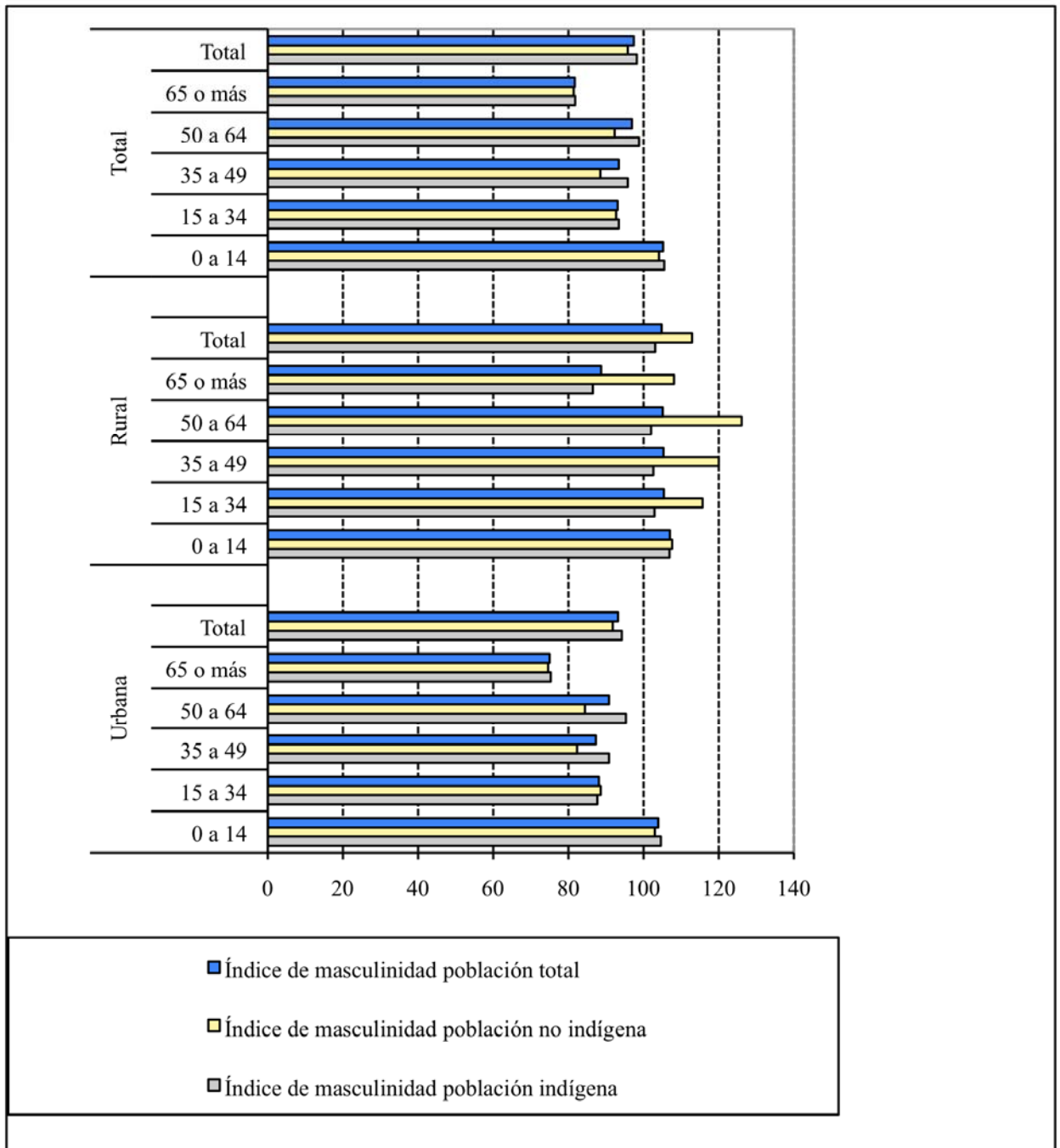


Tabla 5 Índice de masculinidad por grupos de edad y ubicación.

1.6.3 Migración

1.6.3.1 Migración neta absoluta

Considerando sólo aquella población que declaró tener residencia habitual en el país, que nació en el país y además vive en hogares particulares, se tiene un total de 1.187.621 migrantes de toda la vida o migrantes absolutos, lo cual representa el 14,9% de esta población, conformada por 9,6% de población indígena y 5,3% de población no indígena.

Los Departamentos receptores de la población indígena son en orden de importancia Santa Cruz, Cochabamba y La Paz, en tanto que Potosí es el Departamento con mayor número de emigrantes alcanzando casi un 30% en relación al total nacional de emigrantes indígenas; en cuanto a la población no indígena, los Departamentos receptores de ésta son los mismos que los de la población indígena, sin embargo los Departamentos que generan más migrantes son Chuquisaca, La Paz, Potosí y Beni con proporciones similares de alrededor de 15% con relación al total nacional de emigrantes no indígenas.

En la figura 28 se puede apreciar la migración neta absoluta (inmigrantes menos emigrantes), expresada como proporción de la población residente al momento del censo en el Departamento respectivo.

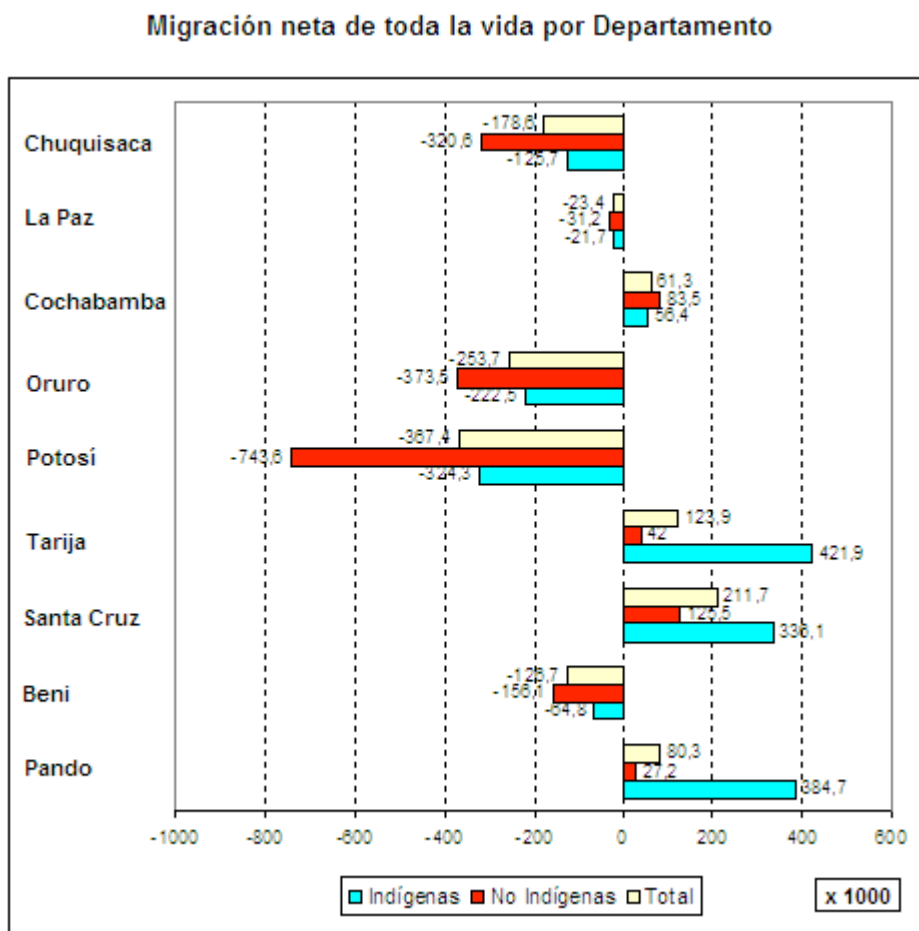


Fig. 28 Migración neta absoluta por Departamento por cada 1000 habitantes residentes

Como se aprecia en el gráfico, los Departamentos de Chuquisaca, La Paz, Oruro Potosí y Beni presentan valores de migración neta absoluta negativos, tanto para la población indígena como para la no indígena, es decir que existe un mayor número de personas que emigran que las que inmigran, por lo tanto, se trata de Departamentos con mayor número de emigrantes.

En el caso específico de Potosí y de la población no indígena, se observa una migración neta negativa de 743 personas por cada mil residentes en dicho Departamento en el momento del censo.

Asimismo, los Departamentos con migración neta positiva de población indígena en orden de importancia son Tarija con 422 personas por cada mil, Pando con 385 personas y Santa Cruz con 336 personas por mil habitantes residentes. En lo que respecta a la población no indígena con saldo positivo, el número de migrantes absolutos es bastante reducido, destacándose únicamente Santa Cruz con 125 personas por cada mil residentes.

**ASPECTOS BIODEMOGRÁFICOS DE GRUPOS ÉTNICOS MACRO-PANO DE BOLIVIA Y CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DE LAS POBLACIONES AYMARÁ, QUECHUA, CHIMANE Y MOSETÉN**

Residencia	Lugar de nacimiento									
	Chuquisaca	La Paz	Cochabamba	Oruro	Potosí	Tarija	Santa Cruz	Beni	Pando	Total
Chuquisaca	327806	3261	3218	2851	30297	1348	5057	262	15	374115
La Paz	6085	1795272	15980	29148	30188	1768	5440	4196	303	1888380
Cochabamba	11578	47019	959202	45979	72715	1269	11158	3256	116	1152292
Oruro	743	16686	8767	258979	17075	289	1110	104	15	303768
Potosí	4915	4978	4887	7307	598190	1103	2644	134	26	624184
Tarija	11980	5224	2933	3087	18031	34118	2856	194	6	78429
Santa Cruz	57414	46855	88413	22478	57655	5269	491300	17344	247	786975
Beni	494	8471	3401	1177	2128	123	2806	93049	690	112339
Pando	133	1587	471	319	306	51	128	1081	2833	6909
Total	421148	1929353	1087272	371325	826585	45338	522499	119620	4251	5327391

Tabla 6 Valores absolutos de migración de toda la vida en población indígena según lugar de nacimiento. Censo Nacional 2001

En la tabla 6 se aprecia que de 421.148 personas que nacieron en Chuquisaca 327.806 permanecen en el Departamento, el resto emigró principalmente a Santa Cruz; para el caso de Oruro se observa que del total de población que nació en este Departamento, más del 10% se desplazó preferentemente hacia Cochabamba; en Potosí de 826.585 personas que nacieron allí, tan sólo permanecen 598.190, lo que representa aproximadamente el 70%, el resto emigró principalmente a los Departamentos de Cochabamba, Santa Cruz, Chuquisaca y La Paz; finalmente en el Beni se desplazó 22% de la población que nació en este Departamento.

Con respecto a la inmigración total absoluta de esta misma población, en el cuadro se pueden apreciar que los Departamentos donde mayormente se concentran son Pando, Tarija y Santa Cruz, con el 59%, 56% y 37% respectivamente. Es decir, que de 6.909 personas categorizadas como población indígena que residen habitualmente en Pando, 4.076 (59%) son inmigrantes provenientes de otros Departamentos y 2.833 nacieron allí.

Finalmente, se desprende de la tabla que el principal flujo migratorio lo encontramos en Cochabamba, como Departamento de nacimiento, y Santa Cruz, como Departamento de destino (algo más de 88.000 migrantes indígenas); en segundo lugar se tiene la corriente Potosí – Cochabamba (73.000) y en tercer lugar Potosí – Santa Cruz (58.000 migrantes indígenas).

1.6.3.2 Migración neta reciente

En el caso de la migración neta reciente, se compara la población de 5 o más años que declaró tener residencia habitual en el país con la que residía hace 5 años en el país antes de la fecha del Censo y que además vive en hogares particulares, considerándose los migrantes aquellos que cambiaron de residencia en aquel tiempo. En este sentido, se tiene un universo de población algo menor a la de la población migrante de toda la vida, específicamente se tiene un total de 391.750 migrantes del año 1996 al 2001, lo cual representa el 5,6% del total de la población considerada.

Se ha hecho una separación de la población en indígena y no indígena y por tanto se tiene que el porcentaje arriba mencionado está conformado por 3,7% de población indígena y 2% de población no indígena.

En la tabla siguiente se muestra la distribución de población migrante reciente, donde los principales Departamentos receptores de población indígena son en orden de importancia Santa Cruz, Cochabamba y La Paz.

Departamentos	Indígenas				No indígenas			
	Inmigrantes		Emigrantes		Inmigrantes		Emigrantes	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
Chuquisaca	18482	7,3	26358	10,4	8692	6,3	15006	10,9
La Paz	31326	12,3	49853	19,6	15454	11,3	25635	18,7
Cochabamba	62382	24,5	51428	20,2	22512	16,4	18854	13,7
Oruro	16905	6,6	27780	10,9	5445	4,0	9317	6,8
Potosí	15174	6,0	51787	20,3	4234	3,1	10777	7,9
Tarija	14025	5,5	7168	2,8	13810	10,1	10467	7,6
Santa Cruz	86203	33,9	27852	10,9	50688	37,0	23090	16,8
Beni	8251	3,2	11502	4,5	11023	8,0	21492	15,7
Pando	1837	0,7	857	0,3	5307	3,9	2527	1,8
Total	254585	100,0	254585	100,0	137165	100,0	137165	100,0

Tabla 6b Población migrante reciente (1996-2001) por condición étnica y Departamento. Censo Nacional 2001

Al mismo tiempo estos dos últimos generadores de población emigrante junto con Potosí, cada uno de ellos presenta proporciones de alrededor del 20% del total nacional de población indígena emigrante; en cuanto a la población no indígena se observa que el Departamento por excelencia receptor es Santa Cruz con una proporción de casi el 37% del total nacional, sin embargo es también un Departamento con mayor población emigrante junto con La Paz y Beni.

Las tasas de migración neta del gráfico muestran la importancia relativa en cuanto al aporte que hace la migración en el cambio poblacional del Departamento.

Migración neta reciente por Departamento (1996-2001)

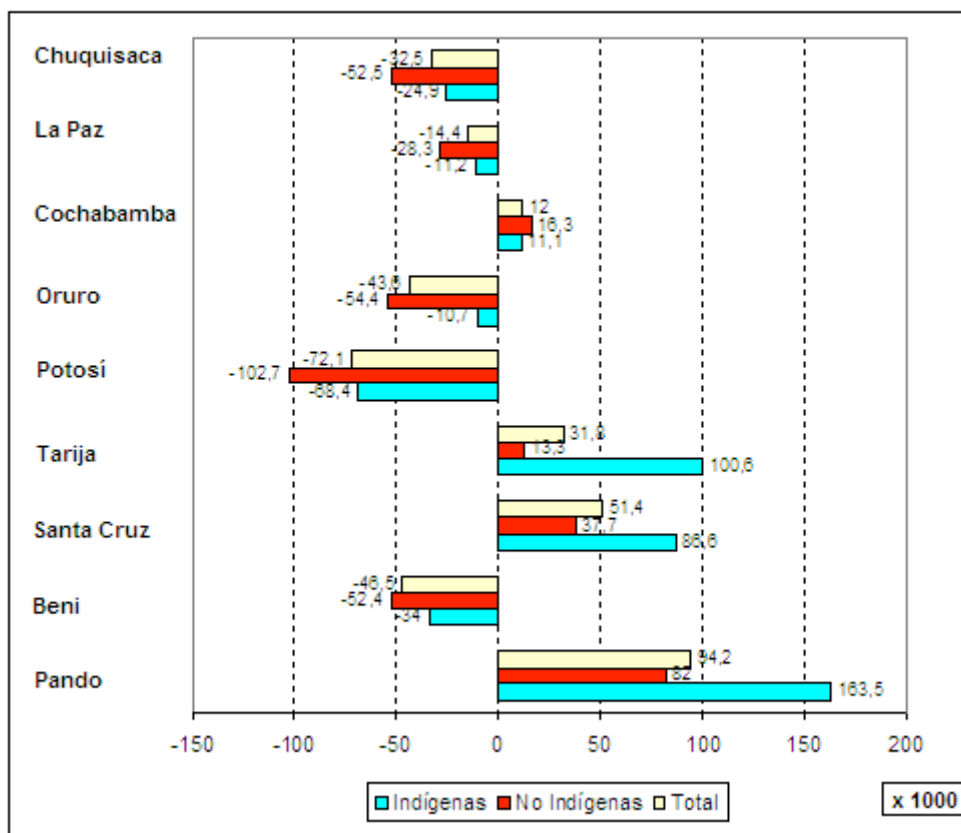


Fig. 29 Migración neta reciente por Departamento por cada 1000 habitantes residentes

En el caso de la migración reciente y con la población especificada como tal, se observa en la figura 29 que los Departamentos de Potosí, Oruro y Beni, tanto para la población indígena como para la no indígena, presentan la mayor intensidad en cuanto a tasas de migración neta negativas del período 1996-2001. En el caso específico de Potosí y la población indígena, muestra una tasa de migración neta negativa de 68 por cada mil personas de 5 o más años de edad y que residen habitualmente en aquel lugar; en tanto que para la población no indígena este mismo dato muestra un valor de 103 personas por cada mil. Asimismo, los Departamentos con mayores tasas de migración neta positiva de población indígena son, en orden de importancia: Pando con 163 personas por cada mil, Tarija con 100 personas y Santa Cruz con 86 personas por cada mil habitantes de 5 o más años de edad y que residen habitualmente en aquellos lugares (se aclara que las diferencias en términos absolutos y relativos son grandes, ya que por ejemplo Pando tiene en términos absolutos una población bastante reducida en comparación al resto de los otros Departamentos y mucho

más con respecto a la población indígena). En cuanto a la población no indígena se aprecia un patrón similar pero con una intensidad menor.

Para conocer los destinos de la población emigrante, se presenta en el cuadro, la matriz migratoria de la población indígena, por Departamento, para el período 1996-2001.

Residencia	Lugar de residencia hace 5 años									Total
	Chuquisaca	La Paz	Cochabamba	Oruro	Potosí	Tarija	Santa Cruz	Beni	Pando	
Chuquisaca	298219	1664	1735	784	9562	987	3576	158	16	316701
La Paz	1398	1622688	8120	6240	4634	1243	6263	3101	327	1654014
Cochabamba	3139	17172	927618	12194	17553	1010	9475	1719	120	990000
Oruro	423	5611	4210	249967	4531	351	1617	143	19	266872
Potosí	2232	2563	4016	2886	520042	933	2386	148	10	535216
Tarija	3829	1864	1306	755	4281	54129	1849	137	4	68154
Santa Cruz	15081	17232	30413	4612	10662	2507	587557	5597	99	673760
Beni	191	3087	1367	228	455	103	2558	87144	262	95395
Pando	65	660	261	81	109	34	128	499	4156	5993
Total	324577	1672541	979046	277747	571829	61297	615409	98646	5013	4606105

Tabla 7 Valores absolutos de migración según el lugar de residencia en los últimos 5 años en población indígena según lugar de nacimiento. Censo Nacional 2001

Los flujos migratorios de la población indígena señalan que los Departamentos de mayor emigración son, en orden de importancia: Potosí, Cochabamba y La Paz, de hecho entre los tres emigran más de 153.000 personas, lo cual significa casi el 60% del total de población total emigrante. Asimismo, si se considera la población propia de cada Departamento, el que más recibe la población emigrante es Pando (en términos relativos aparece como el más importante en cuanto a recepción, pero en términos absolutos tienen la población indígena más escasa de todo el país), alcanzando hasta un 30% de la población indígena, le siguen Tarija y Santa Cruz.

1.6.4 Tasas globales de fecundidad

Bolivia se encuentra en una etapa relativamente temprana de su transición demográfica ya que comenzó de forma tardía la declinación de su fecundidad. Aunque los resultados del último censo confirman la tendencia descendente de la fecundidad, aún se mantiene un nivel relativamente alto (tasa global de fecundidad de 4,3 hijos por mujer).

Esta situación, como en otros países de América del Sur, parece ser debida a que amplios sectores de la población carecen de información y acceso a los medios para controlar sus nacimientos y lograr una buena atención en salud y planificación, por otro lado, detrás de

estos factores, existen razones culturales como cambios en la estructura productiva, aumento del nivel de educación, cambio del rol de la mujer en la sociedad, etc.

Un estudio realizado recientemente a partir del Censo 2001 muestra la existencia de fuertes desigualdades entre áreas geográficas y grupos sociales (INE, 2003). Como ilustración, la fecundidad de la población rural es de 6,2 hijos por mujer, mientras que el promedio urbano es de 3,6. Si se considera la información por Departamentos, se encuentra que los valores más altos corresponden a la población rural de Beni, Pando y Potosí que es del orden de 7 hijos por mujer, y los más bajos están en la zona urbana de casi todos los departamentos con tasas entre 3,3 y 4,1 hijos, salvo en Beni donde es de 4,7.

El estudio mencionado muestra variaciones aún mayores: las mujeres sin instrucción tienen una tasa global de fecundidad de 6,7 hijos, mientras que quienes tienen 13 y más años de estudio tienen una tasa inferior a 2 (una diferencia de casi 5 hijos). Si se considera el idioma hablado, la población que sólo habla Quechua, según el Censo, tendría 7,5 hijos por mujer y la que sólo habla castellano 3,7. Para el caso de la población según condición étnico-lingüística, los resultados de los indicadores son los siguientes.

La población indígena, tiene una fecundidad de 4,8 hijos por mujer, mientras que la no indígena tiene una de 3,7 hijos. La tasa global de fecundidad indígena influye de forma importante en el nivel del país, 4,4 debido a que representa el 66% en la población nacional de 15 años y más.

Mientras que la tasa global de fecundidad indígena se aproxima al valor más alto observado en América Latina, la tasa de la población no indígena, aunque menor, todavía es relativamente alta, 3,7 aproximadamente un hijo más que el promedio latinoamericano.

Aunque los censos anteriores no incluyeron la pregunta sobre auto pertenencia a algún pueblo indígena u originario, es posible tener una aproximación de la tendencia de la fecundidad indígena, ya que sí se investigó la lengua hablada. De esta manera puede establecerse, que al igual que en la población nacional, también se observa una tendencia decreciente en la tasa global de la fecundidad de los que declararon hablar sólo alguna lengua indígena. Así, en el censo de 1976 la tasa era de 6,9 hijos por mujer, en el de 1992 era de 5,3 y en el último del año 2001, dio una tasa de 5 hijos por mujer.

Al considerar las subcategorías étnico-lingüísticas, se observa que la población indígena plena tiene, según el Censo 2001, una tasa global de fecundidad de 5,7 hijos por mujer, la misma de hace 20 años en el país. Esta población, como se indica en secciones anteriores se refiere al 55% del total de los indígenas mayores de 15 años.

En resumen, la situación de fecundidad alta de la población indígena se debe, en parte, a que cerca de la mitad de ella radica en el área rural, estando por lo tanto más alejada de la información y los servicios de atención en materia de planificación familiar. Asimismo, ello se ve potenciado por las barreras lingüísticas y culturales que dificultan el acceso de la población indígena a los programas y el conocimiento de los métodos anticonceptivos modernos.

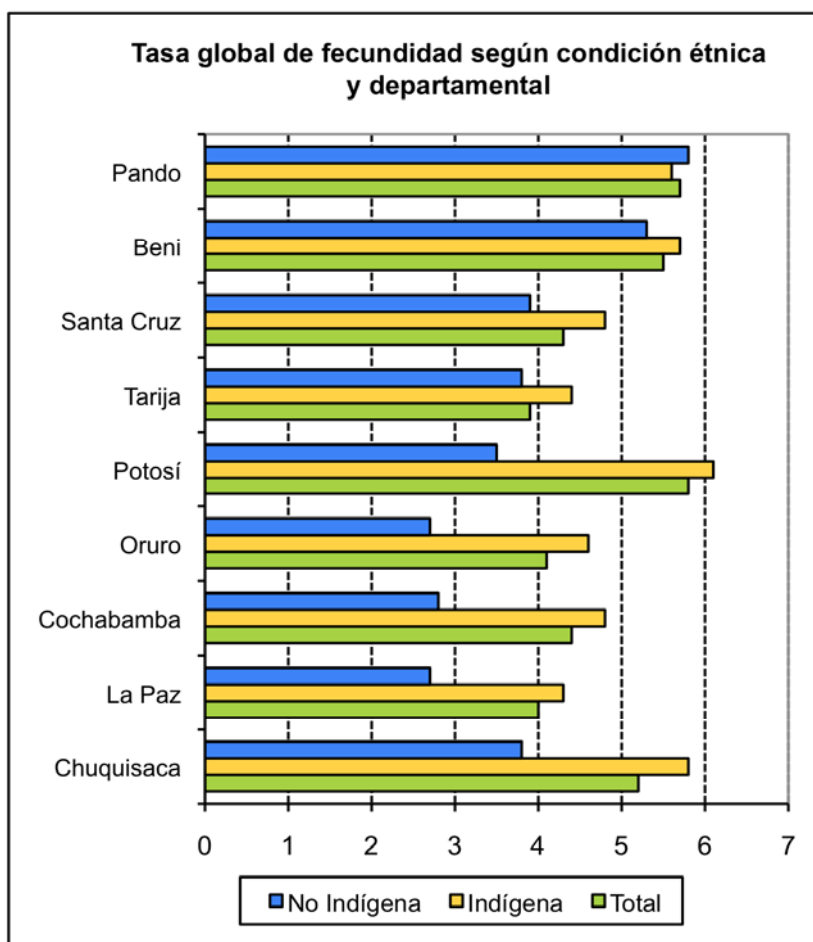


Fig. 30 Tasa global de fecundidad según condición étnica y Departamento

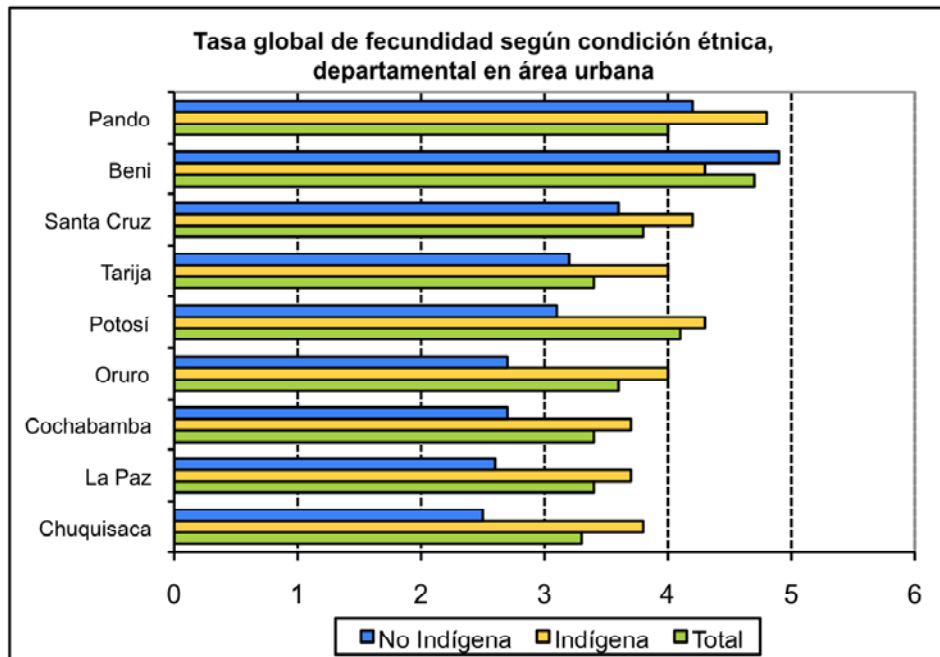


Fig. 31 Tasa global de fecundidad según condición étnica y Departamento en área urbana

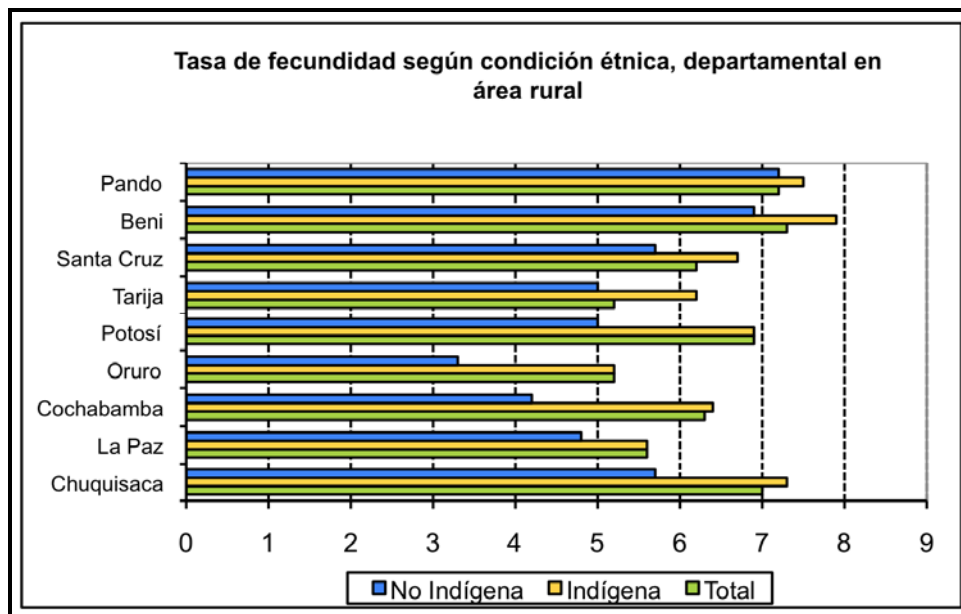


Fig. 32 Tasa global de fecundidad según condición étnica y Departamento en área rural

Según los Departamentos, el comportamiento de la fecundidad es muy variado.

Potosí, Pando, Beni y Chuquisaca tienen la tasa global de fecundidad más alta, superior a 5 hijos por mujer. En estos cuatro Departamentos la fecundidad indígena se mantiene por encima de los 5 hijos, mientras en Potosí y Chuquisaca existen importantes diferencias entre la población indígena y la no indígena, en Pando y Beni prácticamente no se observan diferencias, correspondiendo tasas elevadas en ambas poblaciones. Incluso, en Pando la fecundidad no indígena supera levemente a la de los nativos.

Los otros cinco Departamentos (Cochabamba, Santa Cruz, Oruro, La Paz y Tarija) tienen sus tasas entre 3,9 y 4,4 hijos por mujer, correspondiendo la más baja a Tarija y la más alta a Cochabamba, que se ubica en el promedio nacional. La fecundidad indígena de estos Departamentos es siempre superior a la no indígena, aunque en menor grado en Tarija y Santa Cruz. En este grupo de Departamentos la tasa global de la población indígena varía entre 4,3 y 4,8 y la no indígena entre 2,7 y 3,9 hijos por mujer.

Llama la atención que en estos dos grupos, conformados según los niveles de fecundidad, no se observa una homogeneidad en los tradicionales estratos ecológicos del país. Ambos grupos contienen Departamentos que están en zonas altas y bajas del país, integrados por culturas indígenas y estructuras productivas diversas.

1.6.5 Fecundidad según edad de la madre

Generalmente, el aporte de la fecundidad por edad de la madre se estudia a través del comportamiento de las tasas de fecundidad por grupos quinquenales de edades, las que resultan del cociente de los nacimientos de mujeres de cada grupo respecto a la población correspondiente a esas edades.

La curva de las tasas de fecundidad por edades de las poblaciones indígenas de Bolivia, presentadas en la figura 33, tiene un comportamiento típico de los países latinoamericanos con alta fecundidad y que han comenzado un descenso de la fecundidad.

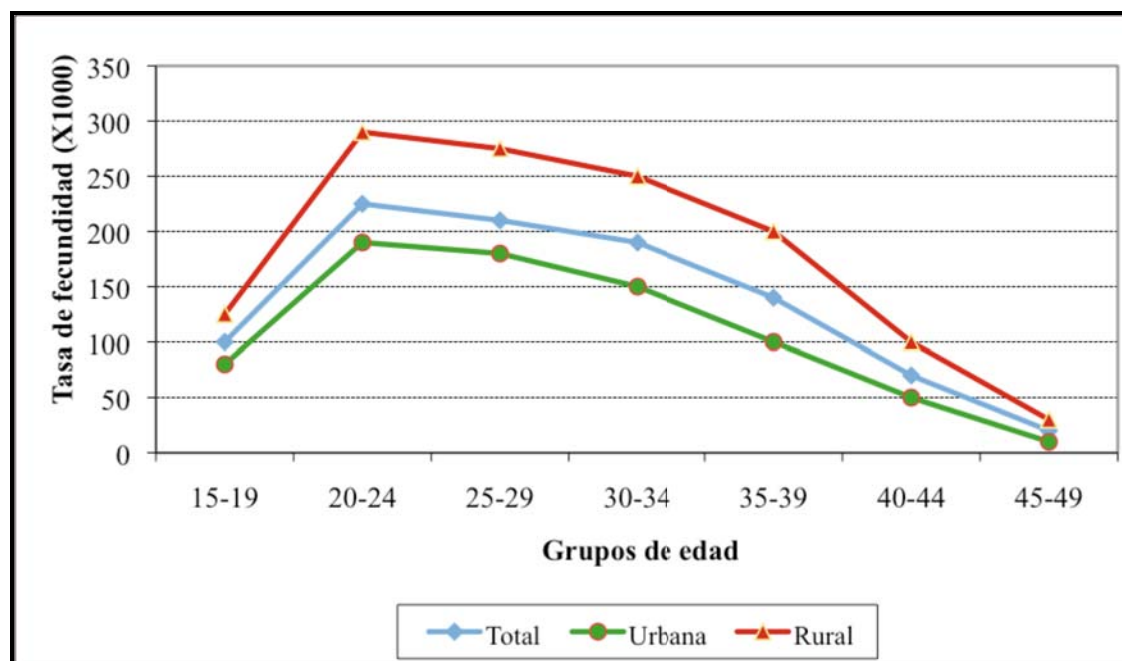


Fig. 33 Tasa de fecundidad por grupos de edad en la población indígena.

Se puede observar que sistemáticamente las tasas de fecundidad de los pueblos originarios son más elevadas en todas las edades. Las diferencias según la condición étnica persisten tanto en el medio urbano como en el rural, pero también son muy notorias las diferencias por área de residencia, independientemente de esa condición.

Además, las curvas de las tasas presentan ya un máximo en el grupo 20 - 24, aunque levemente superior al grupo 25 - 29 años, y todavía una alta fecundidad en edades superiores a los 30 años y en las adolescentes. De esta manera, la reproducción se concentra principalmente en las edades centrales, entre 20 y 35 años y levemente se ha rejuvenecido la edad media de las tasas de fecundidad,

Se espera que la continuación del descenso de la fecundidad siga afectando primordialmente las tasas de mujeres de más edad, dado que las mujeres que limitan sus nacimientos en los países de la región, generalmente lo hacen luego de tener el número deseado de hijos. Eso marcaría una diferencia con países desarrollados en que las parejas postergan su nacimiento para edades superiores o espacian sus nacimientos y, en general, presentan una fecundidad más tardía.

1.7 Recogida de muestras

La recogida de muestras fue uno de los apartados más complejos del trabajo de campo, ya que se tuvo que buscar “*a priori*” un protocolo que permitiera la recolección de las mismas bajo criterios que a la vez fueran efectivos pero ante todo éticos, evitando las visitas relámpago en las que los científicos llegan al asentamiento y marchan del mismo sin dejar rastro. Las muestras fueron recogidas en las campañas (1992, 1994 y 1995) de Julio a Septiembre.

Se considero, que se tendrían que solventar dos pasos imprescindibles: el primero fue contactar con las diversas organizaciones indígenas que con mayor o menor peso, juegan un papel centralizador de la cultura, divulgación y defensa de los intereses de las étnias Chimane y Mometén. Estas autoridades locales a veces dependen o están influenciadas por compañías religiosas que tienen una presencia y un arraigo relativo en las distintas comunidades.

El segundo paso fue pedir el consentimiento a los miembros de las comunidades para la obtención de muestras, explicamos lo más claro posible tanto el Proyecto como el proceso a seguir en cada asentamiento que aceptaba participar, ésto se conseguía después de reunir a toda la comunidad en la posta sanitaria o escuela al atardecer cuando ya habían terminado su jornada laboral, estas reuniones se alargaban unas cuantas horas en las que se dialogaba sobre multitud de aspectos de la comunidad. En alguna ocasión, como en las comunidades de Fátima de Chimanés y “Lugar de Victoriano“ se requirió la ayuda de un interprete porque en la comunidad no había nadie que hablase español.

En las reuniones se intentaba explicar de forma lo más entendedora posible cual era el motivo de nuestra visita y cuáles nuestros objetivos. Cabe decir que en diversas ocasiones se hizo coincidir nuestras visitas a las comunidades con visitas sanitarias llevadas a cabo por médicos del Departamento del Beni, Programas de Planificación familiar organizados por personal sanitario, en colaboración con el Programa Nacional de control de la leishmaniosis mucocutánea auspiciado por la OMS en el que participaba la Dra. Greet Diltiens y con campañas de prevención y tratamiento de enfermedades provocadas por parásitos intestinales.

Las muestras fueron recogidas en distintas localidades de las provincias de Yacuma, Moxos, La Paz, Ballivián y Sur Yungas.

Asentamiento	Provincia
Yucumo	Ballivian
Carmen del Maniqui	
Patacamaya	La Paz
San Juan de Cuverene	Moxos
Bermeo	
San José Cavitu	
San Pastor	
Chontal	
Aguas Negras	
Villa Esperanza	
Puerto San Borja	
San Ignacio	
Santa Ana de Mosetenes	
Palos Blancos	
Fátima de Chimanes	
Santa Rosa del Apere	Yacuma
Carmen Aperecito	
Santa Rita	
Montegrande	
Puerto Moseruna	
Totaizal	
Mercedes del Apere	

Tabla 8. Asentamientos donde se recogieron las muestras.

La etnicidad de los individuos fue asignada sobre la base de la auto identificación que éstos hacían de sí mismos como pertenecientes a una etnia concreta. Sólo fueron estudiados los individuos no emparentados, las relaciones de parentesco fueron determinadas “in situ” a través de una encuesta demográfica donde se tenía en cuenta si hablaban o no la lengua de la etnia.

Las muestras recogidas fueron de dos tipos:

1.7.1 Muestras de cabello

El cabello es una formación queratinizante derivada de la epidermis. Está formado por un extremo libre y por una raíz que termina en un ensanchamiento llamado bulbo implantado en la dermis. La estructura íntima del pelo está formada por tres capas concéntricas:

- La **cutícula** es una envoltura formada por un número variable de capas de células dependiendo del grosor del pelo.
- La **corteza** está formada por células corticales que contienen macro fibrillas de queratina y gránulos de melanina. Esta capa constituye la mayor parte del cabello y contribuye a establecer las propiedades mecánicas de éste.
- La **médula** representa la parte central y puede ser continua, discontinua o inexistente. Está formada por una trama de queratina esponjosa en la que se sustentan laminillas de material amorfo que llenan los espacios vacíos.

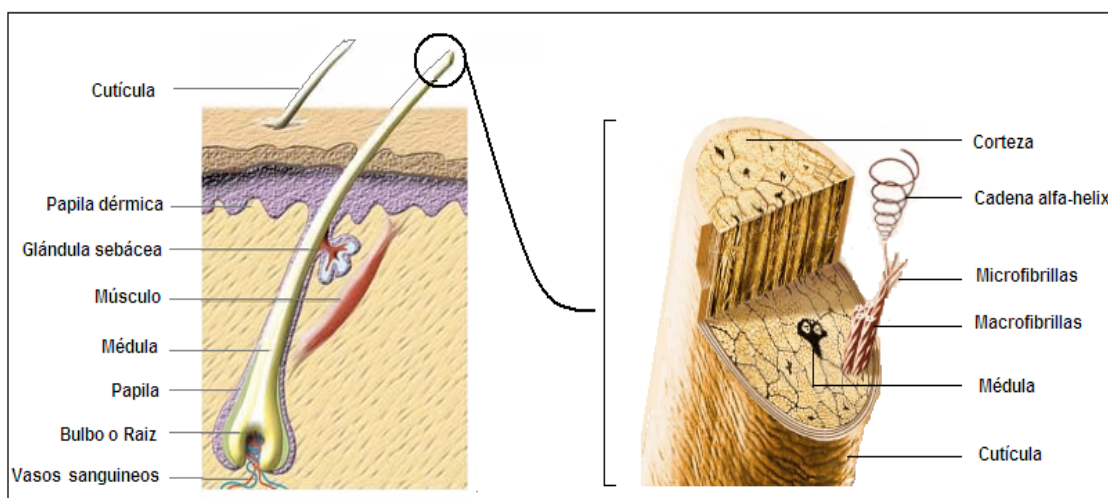


Fig. 34 Esquema de las partes del cabello humano.

Los cabellos son estructuras que muestran diferente composición según la zona que estudiemos. Se trata de un tejido vivo que se va queratinizando a medida que crece. La parte más alejada del cuero cabelludo está formada por células que tienen ocupado su citoplasma totalmente por una proteína estructural llamada queratina que da la forma al cabello. Por tanto, en esta zona distal, las células carecen de núcleo y de ADN. Sin embargo, en la zona proximal (bulbo o raíz), el pelo presenta células nucleadas totalmente activas que contienen ADN. Es imprescindible que los cabellos utilizados para cualquier estudio de ADN presenten bulbo. Pero no todos los cabellos con bulbo son susceptibles de análisis de ADN nuclear, por lo que es necesario realizar una selección previa a la analítica molecular, simplemente visualizándolos al microscopio.

Dentro del conjunto de cabellos que tengan bulbo existen algunos que son mejores que otros para los estudios de ADN. Los cabellos que aún se encuentran en fase de crecimiento presentan bulbo activo rico en células y por ello son idóneos para los estudios de ADN. Los cabellos caducos no presentan tal actividad y por ello no se obtienen resultados positivos en la analítica. Se pueden diferenciar tres fases en la vida de un cabello o pelo: la anagénica (fase de crecimiento y elevada actividad celular), la catagénica (fase de madurez con moderada actividad celular) y la telogénica (fase terminal sin actividad celular).

Los cabellos idóneos para el análisis de ADN son los anagénicos, seguidos de los catagénicos. Como norma general, los telogénicos se desechan si se pretende realizar un estudio de ADN nuclear, pero no si el estudio es de ADN mitocondrial.

Para cada individuo estudiado se obtuvieron dos bulbos pilosos extraídos “*in situ*” y guardados en tubos eppendorf esterilizados que tras su etiquetación fueron reservados de la luz y la humedad hasta su posterior análisis.

1.7.2 Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas en colaboración con el Programa Nacional de control de la leishmaniosis muco-cutánea promovido por la OMS.

Los componentes celulares mayoritarios en el tejido sanguíneo son los eritrocitos (también llamados glóbulos rojos o hematíes) y los leucocitos (glóbulos blancos). Los primeros son células maduras especializadas en el transporte de oxígeno por medio de la hemoglobina. Su citoplasma está ocupado totalmente por esta proteína de transporte y por ello son células que han perdido el núcleo y los orgánulos celulares, al no presentar núcleo no contienen ADN. Sin embargo, la sangre resulta ser una adecuada fuente de ADN por

encontrarse en ella, aunque en menor número, otras células nucleadas, los leucocitos. De este tipo celular es de dónde se extrae el ADN de las muestras de sangre. La cantidad estimada de ADN en sangre completa es de 30-60 $\mu\text{gr}/\text{mL}$ (Kobilinsky, 1992).

La sangre guardada en mancha sobre papel de filtro se conserva mejor que en su estado líquido cuando no hay posibilidad de refrigerarla, como era en nuestro caso. Una única gota de sangre sobre gasa o papel de filtro es suficiente. A partir de 10 μl de sangre completa, que en buen estado puede contener unas 7000-8000 glóbulos blancos por μl , se pueden aislar aproximadamente 500 ng de ADN, aunque siempre depende de la eficacia de la extracción.

Se utilizaron 5 ml de sangre total en papel de filtro de 5 milímetros (Rubilabor 5893 blue ribbon) guardada en tubos falcon de 15 ml previamente esterilizados y que una vez etiquetados fueron reservados de luz y humedad hasta su análisis en laboratorio.

Una vez en el laboratorio, ambos tipos de muestra: cabello y sangre se conservaron a -20°C hasta el momento de la extracción del ADN.

El estudio de asignación de haplogrupos del ADN mitochondrial (ADNmt) se realizó con una muestra de 126 individuos: 33 Aymará, 32 Quechua, 41 Chimane y 20 Mositén.

Para el estudio de secuenciación de la región hipervariable I (HVRI) se han analizado 46 muestras (ver tabla 9) 16 muestras pertenecen a la población Quechua, 10 a la población Aymará, 10 a la población Chimane y 10 a la Mositén.

1.8 La Mitocondria

La mitocondria es un orgánulo celular de aproximadamente 1µm de diámetro, se halla en el citoplasma celular de las células procariotas y eucariotas que utilizan como fuente de energía el oxígeno. El número de mitocondrias por célula varía entre 200 y 1700 dependiendo del tipo de tejido (Bogehagen et al. 1980; Robin y Wong 1988). La forma y longitud pueden variar en función de la actividad de la célula y de la función del tejido.

La ultraestructura de las mitocondria, observable a microscopio electrónico revela la existencia de una doble membrana con un espacio intermembranoso, la membrana más externa es lisa y con una composición muy similar a la membrana plasmática y al resto de las membranas de los orgánulos celulares. La membrana interna, en cambio, presenta una serie de crestas y está compuesta por tres grupos de proteínas, las encargadas del transporte a través de membrana, las directamente implicadas en la cadena respiratoria, y el complejo enzimático ATP sintetasa. La membrana interna envuelve la matriz o contenido mitocondrial con numerosas moléculas iónicas, enzimas, ARN, ADN y ribosomas.

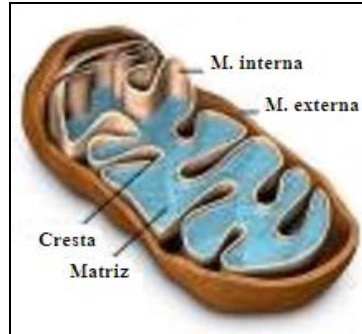


Fig. 35 Ultraestructura de la mitocondria.

La científica Lynn Margulis propuso a finales de los años 80 que algunos orgánulos como las mitocondrias, los cloroplastos y las estructuras vibrátiles de las células tendrían un origen bacteriano, estas bacterias, según ella, fueron incorporadas a una célula procariota ameboide hace más de mil millones de años y actuaron como complejos simbioses. Estas bacterias, con el tiempo perdieron la capacidad de funcionar independientemente, de crecer y duplicarse, de hecho, la mayor parte de las proteínas funcionales de las mitocondrias están codificadas por el ADN del núcleo celular. Margulis basó su hipótesis en la presencia de un cromosoma en el interior de la mitocondria que le da un cierto grado de autonomía e independencia.

Las mitocondrias contienen entre dos y diez moléculas de ADN y una sola célula somática puede contener alrededor de 1000 mitocondrias (Budowle et al. 2003), esto implica que el número de moléculas de ADN mitocondrial en una célula somática puede llegar a ser de más de 100 000 (Michaels et al. 1982; Piko y Matsumoto 1976). Además la mitocondria tiene un código genético distinto al del núcleo celular y por tanto es indescifrable por el sistema celular (Wallace 1982). Algunas de estas modificaciones son por ejemplo que los tripletes AGA y AUU en lugar de codificar el aminoácido arginina son codones “stop” o de parada, UGA codifica el aminoácido triptófano en lugar de ser un codón “stop”. AUA codifica la metionina en lugar de la isoleucina y AUU, AUA, AUG se leen como un codón de iniciación (Anderson et al. 1981; Montoya et al. 1981).

En los humanos el genoma mitocondrial es circular de doble cadena y sin proteínas asociadas. Está constituido por 16569 pares de nucleótidos que conforman 37 genes, de estos genes, 13 codifican algunas subunidades esenciales de los enzimas responsables de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que generan la energía de las mitocondria.: 2 genes codifican RNA ribosómico (12S y 16S rRNA) y 22 genes que codifican el RNA de transferencia (tRNA) necesarios para la síntesis de proteínas mitocondriales.

En 1981 Anderson y otros colaboradores describieron la secuencia completa del ADN mitocondrial y la organización de los genes del genoma mitocondrial humano. La secuencia estándar fue publicada como Cambridge Reference Sequence (CRS). El ADN mitocondrial está constituido por dos cadenas, la cadena pesada H (Heavy Strand), rica en guanina y la cadena ligera L (Light Strand), rica en citosina.

El ADN mitocondrial se divide en dos regiones, la región codificante y la región no codificante o región de control (CR). La numeración de la secuencia estándar de referencia (CRS) fue establecida por Anderson y sus colaboradores a la cual se establecieron modificaciones posteriores (Andrews et al. 1999). La región de control esta comprendida entre la posición 16024 y la posición 16569 siguiendo desde la posición 1 hasta la posición 576. La región codificante va desde esta posición hasta la 16024.

1.9 Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se ha utilizado una resina específica: CHELEX™ 100 (Walsh et al. 1991).

La resina quelante CHELEX™ 100 no contiene disolventes orgánicos y ha demostrado ser un método rápido, simple y tan eficiente para la extracción de ADN como la extracción con el método de la proteinasa K / fenol-cloroformo. Cuando se utiliza este método en el caso de la extracción de sangre en papel de filtro, aparecen menos inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa.

1.10 La reacción en cadena de la polimerasa

La mayor parte de los protocolos que se siguen en el estudio de ADN consisten en extraer el material genético y posteriormente someterlo a una amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es un método “in vitro” para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN de cualquier origen (virus, bacterias, plantas, hongos o animales) y se basa en la amplificación exponencial de una secuencia de ADN conocida (Mullis et al., 1986; Mullis y Faloona, 1987).

La reacción, es especialmente útil por su alta especificidad, su fácil automatización, y por su capacidad amplificadora o copiadora de pequeñas cantidades de muestra. Por todo esto, la técnica ha tenido un gran impacto en campos como la medicina clínica y forense, en el diagnóstico de enfermedades genéticas y en la biología evolutiva. Además, esta técnica ha permitido introducir el estudio de los marcadores de ADN, los cuales presentan un contenido polimórfico mucho mayor que el asociado a los polimorfismos de marcadores proteicos que se solían utilizar en los estudios anteriores.

Se pueden estudiar un gran número de marcadores hipervariables incluso en una única reacción. Las bases teóricas de la PCR no son complicadas. El fragmento de ADN a amplificar está delimitado por dos fragmentos cortos de ADN o cebadores "primers" que se sintetizan químicamente. Estos cebadores son complementarios con las secuencias de bases que flanquean el fragmento a estudiar. Los cebadores inician en el tubo de ensayo una amplificación que se continúa en ciclos sucesivos. En cada ciclo se duplica el número de copias de la secuencia deseada, respecto al ciclo anterior.

Cada ciclo comienza con la separación de las dos cadenas de ADN molde. Posteriormente los dos cebadores se sitúan en sus respectivas secuencias diana complementarias, una de cada cadena.

Una enzima, la ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) que no se altera a elevadas temperaturas, agrega bases en los extremos de los cebadores, alargando las dobles hélices que el cebador había iniciado (Saiki et al. 1985). Como cada cadena produce una nueva hélice doble, se duplica en cada ciclo la secuencia de ADN deseada.

El primer ciclo de síntesis produce nuevas cadenas hijas de longitud indeterminada, las cuales, a su vez, son capaces de hibridar con los “primers”. En el segundo ciclo de síntesis, estas cadenas hijas sirven como nuevos moldes y, en este caso, los fragmentos resultantes ya no tendrán una longitud indefinida, sino que su tamaño estará delimitado por los “primers” de la reacción. Las nuevas cadenas hijas formadas servirán de molde para sucesivos ciclos de síntesis.

La evolución de la técnica ha permitido hacer la reacción cada vez más sencilla y eficaz. Se realiza de forma automática en un termociclador, un aparato compacto que consta de un bloque térmico cuya temperatura va variando según el plan de datos introducido por el usuario y en cuyo interior se depositan las muestras. El aparato está provisto de un termostato que produce oscilaciones constantes y cíclicas de la temperatura muy rápidas. Esta automatización ha permitido mejorar mucho el rendimiento y la reproducibilidad de los experimentos. Cada ciclo transcurre con los siguientes cambios (ver Fig. 36)

1. **Fase de desnaturalización** a 90°C-95°C: se produce la separación (desnaturalización) de las hebras de nuestro ADN molde también llamado "*template*". La temperatura a la cual se alcanza dicha desnaturalización depende de la composición de bases de la doble hélice, siendo necesarias temperaturas más elevadas cuanto mayor número de pares de bases del tipo G-C contenga la molécula (Ruano et al. 1992). Esto se debe al hecho de que la Guanina y la Citosina se unen mediante tres puentes de hidrógeno mientras que la Adenina y la Timina lo hacen mediante dos por lo que resulta lógico pensar que costará más separar pares G-C que pares A-T y por ello serán necesarias mayores temperaturas en el primer caso.
2. **Fase de apareamiento o hibridación** ("*annealing*") de 40 a 60°C: se colocan los cebadores o “primers” en las zonas complementarias de la hebra molde. Sin este apareamiento inicial de los cebadores la polimerasa no puede comenzar a trabajar. La

temperatura a la que transcurre el "annealing" es específica de la secuencia y longitud del cebador y se determina experimentalmente, aunque existen algunos métodos que pueden ayudarnos a la elección de la temperatura de annealing antes de realizar el experimento. La elección de la temperatura en este paso es un parámetro crítico pues si es demasiado alta no se producirá anillamiento y no habrá amplificación y si es demasiado baja se incrementará el anillamiento inespecífico y aparecerán productos no deseados (si el extremo 3' de un primer se anilla en cualquier lugar del molde, aunque el resto del "primer" no se anille específicamente, el oligo será elongado).

3. **Fase de elongación** o extensión a 70-75°C: con los cebadores apareados, la polimerasa comienza a sintetizar la hebra complementaria mediante la adición al extremo 3'OH de desoxinucleótidos libres disponibles en la mezcla de reacción (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), de tal forma que el crecimiento de la nueva hebra se realiza en sentido 5' → 3'. El orden o secuencia de los nucleótidos de la hebra "hija" viene determinada por el orden de la hebra "madre", basándose en las reglas de complementariedad (Adeninas siempre apareadas con Timinas y Citosinas con Guaninas). La temperatura más comúnmente usada es 72°C pues esta temperatura se encuentra cerca de la temperatura óptima de actuación de la Taq polimerasa (75°C), pero la elongación suele comenzar ya durante el anillamiento, pues a 55°C la Taq es parcialmente activa.

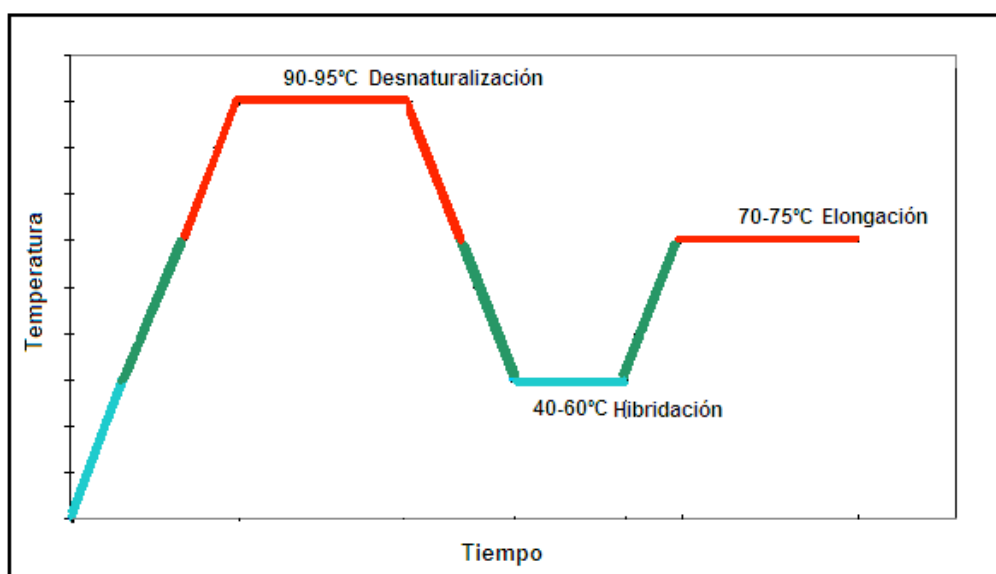


Fig. 36 Gráfico que representa las variaciones de temperatura de cada ciclo PCR.

Cada una de estas fases requiere un tiempo mínimo para ser efectiva. Este tiempo mínimo se determina de manera empírica y es conveniente no alargarlo para evitar el riesgo de envejecimiento de la enzima. Suele oscilar entre 30 segundos y varios minutos según la fase en la cual nos encontremos.

- **Fase de desnaturalización:** Se aconseja un tiempo de 30-60 segundos a 94°C, este tiempo suele ser suficiente para obtener buenos productos para la PCR. Si prolongamos el tiempo de desnaturalización, aumentaremos el tiempo al cual la enzima está sometida a elevadas temperaturas y por ello se incrementará el porcentaje de moléculas de Taq que pierden su actividad. De cualquier manera, el tiempo de desnaturalización debe incrementarse si el ADN molde tiene un contenido elevado de pares GC.
- **Fase de hibridación o apareamiento:** para la mayoría de las reacciones PCR es suficiente un tiempo de 30-60 segundos en esta fase.
- **Fase de elongación:** El tiempo de incubación para la elongación varía según la longitud del fragmento que queramos amplificar pues la actividad de la Taq polimerasa a temperatura óptima suele ser de 2000 nucleótidos incorporados por minuto; el tiempo de extensión en la reacción, por tanto, se puede calcular de acuerdo con la actividad de la enzima (desde unos 20 segundos para fragmentos de menos de 500 pares de bases, 40 segundos para unos 1200 pares de bases, hasta varios minutos para fragmentos de varias Kilobases).

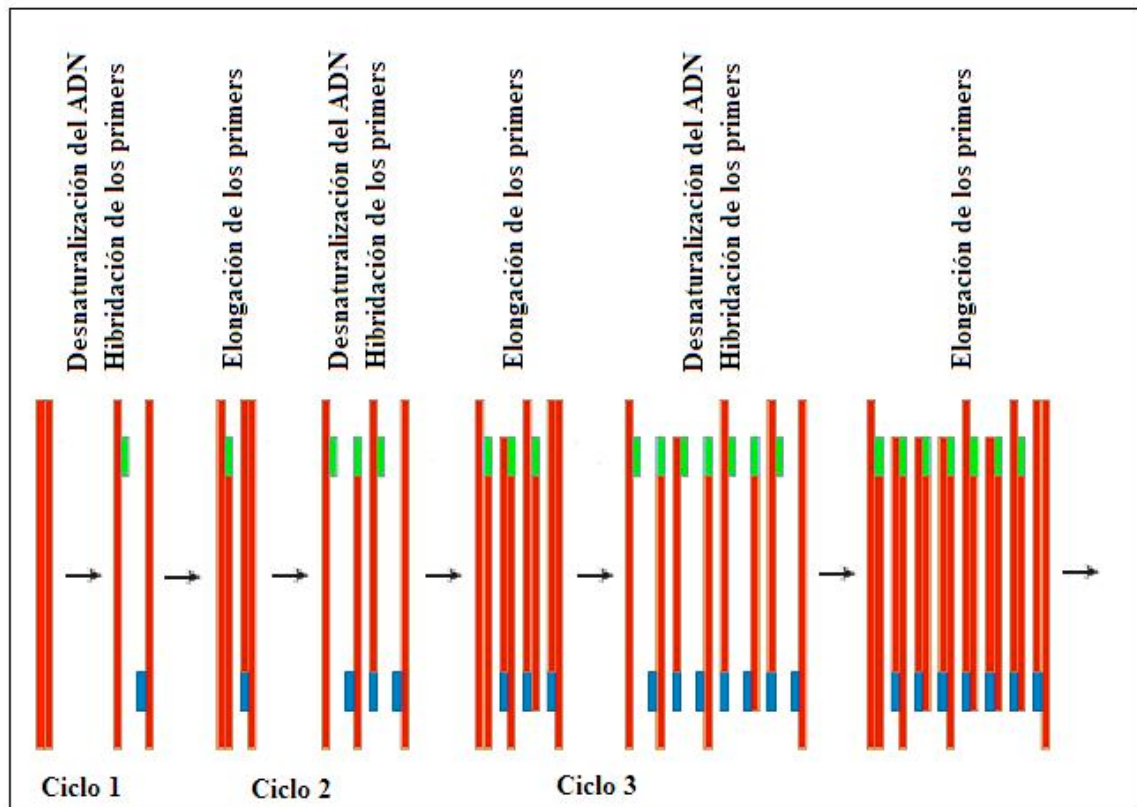


Fig. 37 Desarrollo de un ciclo de PCR.

Lo mismo ocurre con el número de ciclos de PCR, se determina de manera empírica y oscila entre 20 y 35. Si interesa obtener una mayor cantidad de producto amplificado se puede aumentar este parámetro, pero se tiene que tener en cuenta que dicho aumento irá en detrimento de la calidad, es decir, aparecerán más errores en las nuevas moléculas debido al empobrecimiento de la reacción.

Antes del comienzo de los ciclos es conveniente realizar un paso único de desnaturalización largo (5 minutos a 93-96°C) para asegurar que el ADN molde se desnaturaliza totalmente aunque sea muy largo. Y al final de los ciclos se suele añadir un paso único de elongación largo (5-15 minutos a 72°C) para que se termine la formación de los productos PCR generados durante la reacción. Si bien, algunos autores no recomiendan esta estrategia, pues describen, basándose en su experiencia para un gran número de loci, que estos dos pasos adicionales no modifican los resultados de la reacción PCR. Por tanto, para realizar este tipo de reacciones se necesita:

un ADN de partida que es el que vamos a copiar (ADN molde) procedente de las muestras a analizar. En nuestro caso se trata de ADN humano.

Los “primers” cuya función es señalar la zona concreta a multiplicar y aportar un extremo 3'-OH libre para que la polimerasa pueda empezar a actuar. En general se recomienda que el tamaño de los oligos se encuentre entre 20 y 30 nucleótidos. Una mayor longitud ayudará a obtener una mayor especificidad. Su concentración recomendada oscila entre 0,1 y 0,5 μM . Una concentración demasiado elevada puede producir inespecificidad en el alineamiento mientras que si hay escasez puede producirse el agotamiento antes del fin de la reacción, perdiendo así rendimiento.

Nucleótidos (dNTPs) que formarán las nuevas cadenas de ADN y que siempre se añadirán a la reacción manteniendo la misma concentración final de cada uno de ellos para evitar errores en el proceso de copia del ADN molde. La cantidad de dNTPs a utilizar en la reacción dependerá de la longitud del fragmento a amplificar y se suelen añadir en exceso pero, como veremos, los dNTPs reducen el Cl_2Mg libre y por ello no debe incrementarse demasiado su concentración final. La concentración final de cada dNTP para el buen funcionamiento de la Taq polimerasa suele ser de 200 μM , a una concentración de Cl_2Mg de 1.5 mM.

En un volumen total de reacción de 25 μL , teóricamente estos nucleótidos permiten la síntesis de aproximadamente 6-6.5 μg de ADN, cantidad suficiente para reacciones de un solo locus (“singleplex”) o de varios loci a la vez (“multiplex”).

La enzima ADN polimerasa, en este caso termoestable, que lleve a cabo todo el proceso. Se utiliza la ADN polimerasa aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (de ahí el nombre de Taq polimerasa) la utilización de la polimerasa de dicha bacteria supuso un enorme avance respecto a técnicas anteriores que utilizaban polimerasa extraídas de otros microorganismos ya que se evita el proceso de tener que estar pendiente continuamente del proceso PCR (Saiki et al. 1988). La Taq polimerasa es estable a elevadas temperaturas y permite incrementar las temperaturas de alineamiento de los cebadores con el ADN, lo cual mejora de forma significativa la astringencia de la reacción y, en definitiva, la especificidad de los productos.

La enzima consta de una sola cadena polipeptídica de 95 kDa, es muy activa en su función polimerasa 5' \rightarrow 3' y carece de actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5'. Existe actualmente una modificación de esta enzima, la Ampli-Taq Gold ADN polimerasa, que se comercializa de forma inactiva. Un paso inicial en la PCR de 9-12 minutos a 94-95°C (“Hot Start PCR”) produce su activación disminuyendo así la formación de productos inespecíficos. La cantidad

de enzima recomendada habitualmente es de 1-2 Unidades para un volumen de reacción de 25 μ L

El Mg^{2+} es un factor indispensable en las reacciones PCR porque actúa como cofactor de la enzima Taq polimerasa. Se suele añadir a la mezcla de reacción en forma de Cl_2Mg y forma complejos solubles con los dNTPs para producir el sustrato real que la enzima reconoce. La concentración óptima varía entre 0,5 mM hasta 5 mM y la concentración real libre en la reacción depende de la concentración de compuestos capaces de unirse al Cl_2Mg , como los dNTPs, el pirofosfato libre y el EDTA.

Tubos especiales capaces de transmitir los cambios de temperatura a la muestra con la misma rapidez y cuyas paredes son más finas de lo normal. Se ha de tener en cuenta además que el calentamiento de la muestra a altas temperaturas induce a su evaporación, por lo que es conveniente añadir una capa de aceite mineral en la parte superior, aunque actualmente existen termocicladores que ya incorporan una cubierta caliente en el bloque que impide la acumulación de la solución en la parte superior del tubo.

El resultado es la amplificación de un producto génico un número determinado de veces. Como los productos sintetizados en un ciclo pueden servir como molde en el siguiente, el número de copias de ADN se dobla en cada ciclo. Así pues, después de 20 ciclos, la PCR rinde 220 copias (ver Fig. 38). Para amplificaciones que no presentan “a priori” problemas se recomiendan 28-30 ciclos, pero este número se puede aumentar si el rendimiento de la PCR es bajo debido por ejemplo a la escasa cantidad de ADN molde.

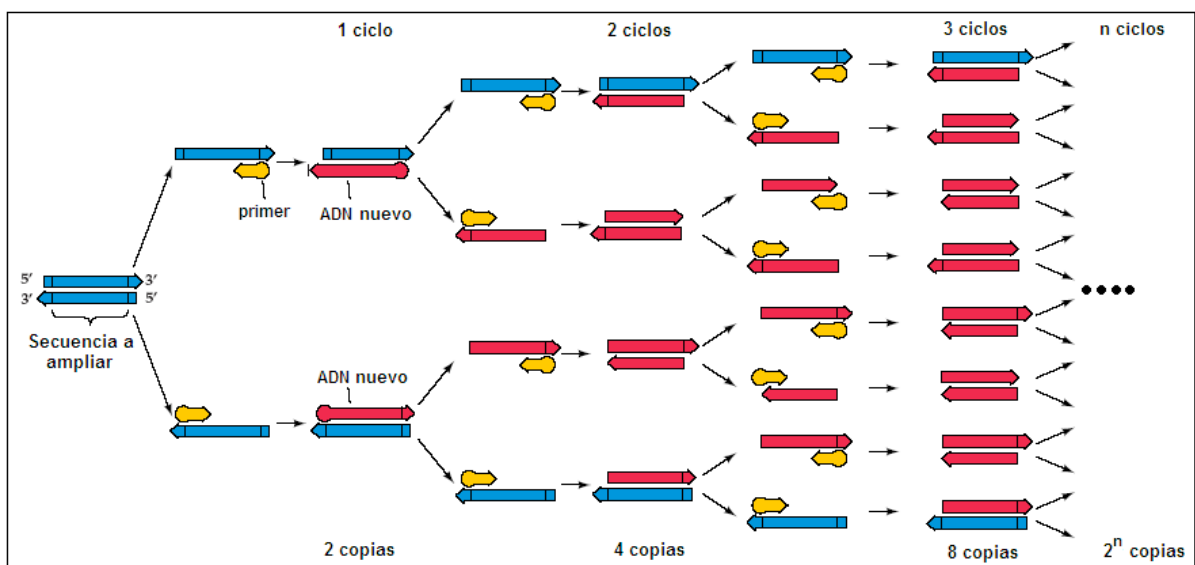


Fig. 38 Desarrollo de una reacción PCR de n ciclos.

Resumiendo, la técnica descrita es extraordinariamente sensible, es posible teóricamente generar miles de millones de copias a partir de una molécula de ADN. Una o muy pocas moléculas de ADN intactas que sobrevivan en un tejido pueden amplificarse por PCR.

La elevada sensibilidad de la PCR puede ser a veces un inconveniente. Cualquier fragmento de ADN exógeno a la muestra que caiga en el experimento será amplificado si lleva secuencias que puedan ser reconocidas por los primers, con lo que se pueden obtener falsos positivos (Kwok y Higuchi, 1989). Existen varias fuentes potenciales de contaminación:

- Contaminación con ADN humano procedente del ambiente de trabajo.
- Contaminación mediante ADN de origen bacteriano o fúngico procedente incluso de la propia muestra a analizar, que si bien no se espera que anille con los cebadores por tratarse de ADN no humano, sí puede interferir en la reacción disminuyendo el rendimiento de la misma.
- Contaminación cruzada de unas muestras a otras durante la preparación de las mismas. Este hecho es habitual cuando se procesa un gran número de muestras a la vez por la gran atención que se requiere durante un tiempo más o menos largo.

La fuente de contaminación más peligrosa es la que se conoce como "carry-over" de productos de amplificación y ocurre cuando un ADN ya amplificado contamina a una muestra que todavía no ha sido amplificada. El producto PCR contaminante sirve como molde ideal para amplificaciones posteriores y obtendremos así resultados erróneos. Este tipo de contaminación puede suceder bien de forma directa, o bien indirecta como con aerosoles de una punta de pipeta sin filtro por ejemplo.

Todos estos problemas han obligado a establecer procedimientos que aseguren una buena calidad en el análisis de las muestras entre los que podemos destacar:

- Separación física en el laboratorio del área de extracción del ADN y preparación de la reacción PCR y el área de manipulación del producto amplificado.
- Uso de guantes desechables cambiándolos frecuentemente.
- Uso de reactivos de buena calidad libres de nucleasas y autoclavados, siendo recomendable que cada operario mantenga su propio material de PCR de forma que resulte más fácil controlar las contaminaciones.

- Cerrar siempre los tubos que contiene la muestra, los reactivos y las cajas que contienen las puntas de pipeta mientras no se estén usando.
- Uso de puntas con filtro desechables estériles utilizando una punta para cada muestra.
- Centrifugar los tubos brevemente antes de abrirlos para evitar la dispersión de pequeñas gotitas de la muestra en el área de trabajo.
- No procesar un elevado número de muestras a la vez ni durante la extracción ni durante la amplificación.
- Incluir muestras control en cada amplificación de forma que podamos detectar la presencia de cualquier contaminante.

1.11 El ADN mitocondrial

El genoma mitocondrial es circular, de doble cadena, semi-autónomo, no presenta proteínas asociadas y codifica para 38 genes, de los cuales. El ADNmt contiene información de 38 genes: 2rRNA (12S y 16S), 22tRNA y 13 genes estructurales, los cuales codifican diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa:

- 3 subunidades de la citocromo c-oxidasa (COI, II y III) (Complejo IV)
- Una subunidad de la citocromo b (cyt b) óxido-reductasa (complejo III)
- 7 subunidades (ND-1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6) del complejo NADH deshidrogenasa (Complejo I)
- 2 subunidades (6 y 8) del complejo ATP sintetasa (Complejo V).

El ADNmt presenta un código genético diferente al del genoma nuclear pues no puede ser transcrito ni traducido por elementos nucleares. Anderson y colaboradores describieron la secuencia completa y la organización de los genes del genoma mitocondrial humano en el 1981. La secuencia publicada es la secuencia de referencia estándar (CRS).

La región mayor no codificante, conocida como región de control, D-Loop o Región hiper variable (HVR), ocupa 1122 pares de bases y se sitúa entre el gen que codifica para el RNA de transferencia de la prolina y el de la fenilalanina. En la región control donde se origina la replicación de la cadena H se localizan los promotores para la transcripción de las dos hebras (PL y PH), dos lugares de unión de factores de transcripción (Tfam), tres bloques

de secuencias conservados asociados con el inicio de la replicación (CSBI, II y III) y las secuencias asociadas a la terminación de cadenas (TAS) (Coskun et al. 2003; Foran et al 1988). La Región Control destaca por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes (Vigilant et al. 1991) y por su elevada variabilidad intrapoblacional. Esta variabilidad se concentra en tres regiones o segmentos hipervariables: HVSI (posiciones 16024-16365), HVSII (posiciones 73-340) y HVSIII (posiciones 438-574) (Lutz et al. 1998; Vigilant et al. 1991). La más polimórfica es la HVSI, por lo que ha sido muy empleada por la Antropología, la Genética y la Medicina Forense.

El ADN mitocondrial está formado por dos cadenas, la cadena pesada H (*Heavy strand*) rica en guanina, y la cadena ligera L (*Light strand*) rica en citosina. En el genoma mitocondrial, (de 16.569 pares de bases) se diferencian dos regiones: la región codificante y la no codificante o región de control (CR). La numeración de la secuencia estándar se estableció arbitrariamente empezando alrededor de la mitad de la región control, en el origen de replicación de la cadena pesada, de tal manera que la región control se expande desde la posición 16024 hasta la posición 16569, y sigue desde la posición 1 hasta la 576.

La región no codificante representa el 90% del genoma mitocondrial y contiene 37 genes de los cuales 28 son codificados por la cadena pesada (H) y 9 por la cadena ligera (L). Todas las secuencias codificantes son continuas a lo largo del genoma mitocondrial y no existen intrones. Consta de 1.121 pares de bases, la región de control (CR), o D-loop (desplazamiento del bucle) nombre que deriva de la estructura de bucle visible en el microscopio electrónico que se forma durante la replicación del ADNmt. La región de control contiene el origen de replicación OH y las secuencias asociadas con la finalización del desplazamiento del bucle en la replicación. También contiene las secuencias de control de la transcripción y los promotores de ésta (Pn y PL). Dentro de la región de control existen porciones altamente variables entre individuos y selectivamente neutras. Fueron definidas como segmento hipervariable I (HVS-I) y segmento hipervariable II (HVS-II).

La secuencia completa del ADNmt humano, perteneciente a un individuo de origen europeo, se publicó por primera vez en 1981 (Anderson et al. 1981). Desde entonces se emplea como la “secuencia consenso” (*CRS o Cambridge Reference Sequence*) con la que se comparan las diferencias encontradas en otros tipos mitocondriales. Un reanálisis reciente de la secuencia ha revelado la existencia de 4 errores y de 7 polimorfismos poco comunes en la publicación original, ninguno de ellos en la HVSI (Andrews et al. 1999).

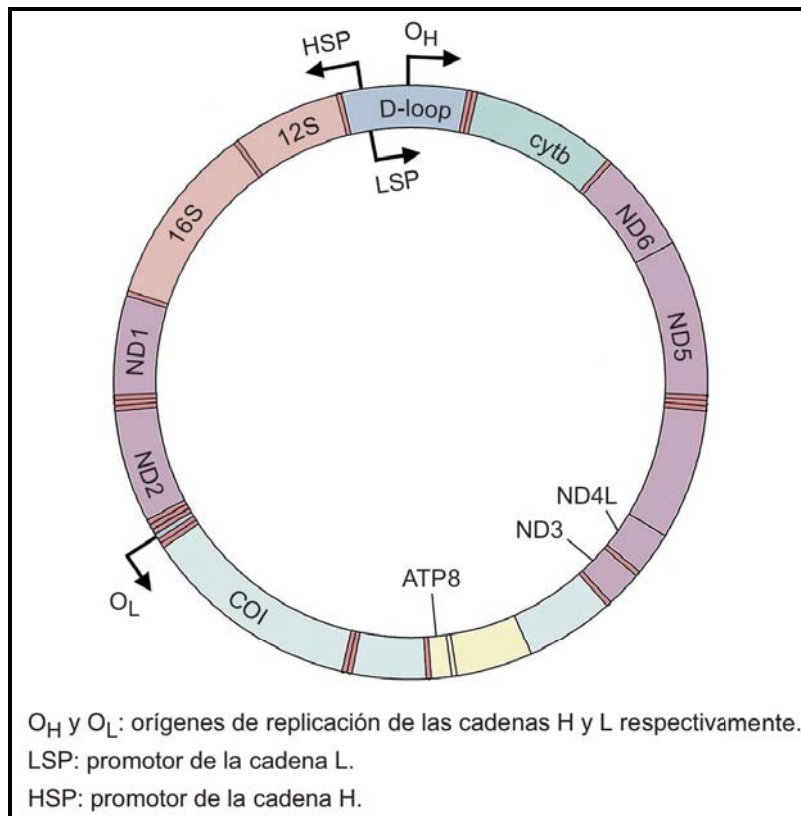


Fig. 39 Organización genómica del ADN mitocondrial humano. (Arroyo et al, 2010)

1.11.1 El ADNmt como herramienta genética

El genoma mitocondrial representa una minúscula parte del genoma nuclear humano, pero su contribución a la reconstrucción del pasado filogenético humano es enorme. El ADNmt es una herramienta muy potente en estudios de evolución humana por presentar herencia materna y una tasa de mutación elevada.

1.11.2 Herencia materna

El ADNmt se transmite a los descendientes únicamente por vía materna debido, en gran parte, a la diferencia numérica. El ovocito maduro contiene aproximadamente unas 100.000 moléculas de ADNmt, mientras que el espermatozoide contiene sólo entre 100 y 1500. Por otra parte, el poco ADNmt (la mayoría se encuentran en el cuello del espermatozoide que no llega a entrar en el ovocito durante la fecundación) es eliminado en un estadio precoz de la embriogénesis. Por ello no hay ADNmt paterno en caso de fertilización in vitro por inyección intracitoplasmática de espermatozoide. No obstante, la presencia de ADNmt paterno se ha encontrado en embriones humanos anormales (poliploides) generados por la misma técnica.

El hecho de presentar una herencia estrictamente materna nos aporta cierta información (Arroyo et al. 2010):

1. El ADNmt es un genoma homogéneo, todas las moléculas de ADNmt en un individuo son las mismas (homoplasmia), excepto en casos anormales de heteroplasmia.
2. El ADNmt no recombina, de tal manera que las diferencias entre dos secuencias mitocondriales representan solo las mutaciones que se han acumulado desde la separación con la secuencia ancestral.
3. Todos los individuos que pertenecen a un mismo linaje materno presentan la misma secuencia.

1.11.3 Tasa de mutación

La tasa de aparición de nuevas mutaciones en el ADNmt es de 10 a 17 veces más elevada que en el genoma nuclear. Los segmentos hipervariables de la región control presentan una tasa de mutación más elevada que a región codificante. La acumulación rápida de polimorfismos en el ADNmt se puede atribuir a algunas características únicas de este sistema genético (Arroyo et al. 2010):

- La mitocondria no dispone de un sistema eficiente de reparación de ADN, lo que permite que se acumulen más cambios introducidos por error.

- El ADNmt no está asociado a proteínas protectoras como las histonas, está asociado a la membrana interna donde se generan los radicales libres altamente mutagénicos.
- Un mecanismo anormal de la mitocondria, como por ejemplo un incremento del metabolismo oxidativo, puede acelerar la tasa de mutación.

Ello se ha relacionado con las características de este material genético y con el entorno que lo rodea. El ADNmt no está protegido por proteínas histonas como el ADN nuclear y se ve continuamente expuesto a la acción de los radicales libres generados por el metabolismo oxidativo. Además, se ha demostrado que los sistemas genéticos de reparación del ADNmt son menos eficientes que los nucleares. Los tres factores bastarían, en principio, para explicar la elevada tasa de mutación del ADNmt, pero hay que añadirles, además, la elevada susceptibilidad de este material genético a los efectos de la deriva genética, mecanismo mediante el cual las mutaciones que experimenta tienen elevada probabilidad de fijación (Wallace 1994).

El cálculo de la tasa de mutación del ADNmt puede realizarse por dos métodos: contando el número de mutaciones acumuladas entre dos o más especies o poblaciones relacionadas de las que se conoce la fecha de divergencia; o bien directamente a través del análisis de *pedigrees* familiares.

1.11.4 Poliplasmia y Heteroplasmia

Recibe el nombre de poliplasmia el elevado número de copias de ADNmt que existe en cada mitocondria y, por extensión, en la célula. En el interior de la célula el ADN mitocondrial se encuentra unido a ciertas proteínas (*binding proteins*), formando un complejo denominado nucleoide. Una mitocondria puede contener entre 2 y 10 de esas estructuras, por lo que el número de copias de ADNmt por célula oscila entre 1000 y 10000 (Malyarchuk et al. 2002, Giles et al. 1980). Tal particularidad hace muy recomendable el estudio de ADNmt en los casos en los que el material genético de partida sea muy escaso o esté muy degradado, como acostumbra a suceder cuando se estudian restos antiguos.

Durante un tiempo se cuestionó la transmisión exclusivamente matrilineal del ADNmt. Algunos estudios de herencia del ADNmt en familias son contradictorios a este respecto. Mientras que Parsons et al. (1998), y Torroni et al. (1998), no hallaron evidencias

de herencia paterna en ninguno de los descendientes analizados, otros científicos señalaron evidencias de recombinación entre el ADN mitocondrial de origen materno y paterno (Schwartz y Vissing 2002; Hagelberg et al. 1999). Algunos sugirieron que la elevada tasa de homoplasia en el ADNmt podría ser debida a la existencia de recombinación, más que a la presencia de “*hotspots*” o puntos calientes mutacionales. Estos estudios han sido desmentidos y en algún caso han sido rectificadas. De hecho, ni el análisis de las bases de datos de ADNmt humano más extensas (Ingman et al. 2000; Elson et al. 2001) ni la aplicación de nuevos métodos para detectar la recombinación (Worobey 2001), consiguieron identificar ningún evento de recombinación potencial.

El concepto de heteroplasma es la presencia de tipos diferentes de ADN mitocondrial en la misma mitocondria, célula o individuo. En contraposición, se denomina homoplasma a la presencia de un único tipo de ADNmt.

La heteroplasma en el ADNmt puede producirse por errores en su replicación o por el daño causado por radicales libres resultantes del metabolismo oxidativo. Entonces afecta a las moléculas de ADNmt del oocito y puede transmitirse a la descendencia, la cual habitualmente manifiesta niveles variados de la misma debido a la segregación aleatoria de las mitocondrias durante la oogénesis.

En humanos la heteroplasma del ADNmt suele estar relacionada con enfermedades mitocondriales y el porcentaje de heteroplasma suele guardar una relación directa con la severidad de la enfermedad en el individuo (penetrancia).

En la región control existe una elevada frecuencia de heteroplasma asociada a la longitud de las poli-Citosinas. En la HVSI la mutación 16189T→C, genera una heteroplasma de longitud en el segmento de poli-C entre las posiciones 16184 y 16193, que oscila entre los 8 y los 14 residuos. En la HVSII existen casos, algunos asociados a ciertos haplogrupos europeos. Este es el caso de la variabilidad asociada a la longitud del primer segmento de poli-Citosinas del motivo C₇-T-C₅ (posiciones 00303-00316). En el haplogrupo J se han descrito dos sub-haplogrupos (C₈-T-C₆ y C₇-T₂-C₆) con heteroplasma en la longitud del segmento citado. En algunos portadores del haplogrupo I europeo hay, también, heteroplasma asociada al tracto de poli-Citosinas en la misma región, a partir de la posición 00568. En la región control se ha descrito, asimismo, variabilidad en el número de repeticiones de CA a partir de la posición 00514.

La heteroplasma en las regiones no codificantes es común en las células somáticas, lo que probablemente guarde cierta relación con el proceso de envejecimiento celular

(Calloway et al. 2000). Así mismo, la heteroplasmia en las células germinales ha demostrado ser más común de lo que se afirmaba inicialmente.

La heteroplasmia es el primer nivel de manifestación del polimorfismo pues si surge una mutación en alguna molécula de ADNmt de un oocito, el individuo descendiente presentará inicialmente una mezcla de moléculas originales y mutantes.

Para que el polimorfismo se establezca es necesario que la mutación pase a los descendientes, adquiriera un estado homoplásmico a nivel individual y, finalmente, se fije en la población. La nueva mutación puede perderse en diversas fases del proceso. Sin embargo, hay evidencias de que la homoplasmia puede llegar a alcanzarse en una o dos generaciones. La segregación aleatoria de las mitocondrias durante la oogénesis no permite explicar la rapidez de este fenómeno por sí sola. Una posibilidad sugerida por algunos autores es que, durante la oogénesis, se produzca una especie de cuello de botella en el que el número de moléculas de ADNmt se reduzca drásticamente (Hauswirth y Laipis 1982; Ashley et al. 1989). En este caso, el ADNmt de los oocitos maduros y el embrión derivado de los mismos descendería de un subconjunto del ADNmt total de la célula progenitora.

Aunque una mutación llegue a alcanzar el nivel de homoplasmia en una o dos generaciones, podría no fijarse en la población a causa de la deriva genética. El análisis de la variabilidad genética del pasado revela este hecho como evidente (Arroyo-Pardo et al. 2010).

1.11.5 Medida de la diversidad

La variabilidad mitocondrial puede analizarse mediante dos métodos: los índices de diversidad y la distribución de las diferencias por parejas.

Los índices de diversidad proporcionan una medida de la cantidad de variación genética de una población, siendo especialmente útiles para realizar comparaciones aproximadas entre poblaciones. Los más utilizados en el estudio de la variabilidad del ADNmt de las poblaciones actuales son:

1. Número de posiciones variables (v),
2. Número de haplotipos diferentes (k),
3. Diversidad genética (o haplotípica) de Nei (H),
4. Diversidad nucleotídica (π)

Otra forma habitual de representar la diversidad del ADN mitocondrial es la distribución de las diferencias por parejas, también conocida como “*mismatch distribution*” también como mean pairwise differences. Este tipo de representación es adecuado para aquellos datos en los que pueden computarse diferencias discretas entre los diferentes alelos, haplotipos en el caso del ADNmt. Las diferencias pueden ser sustituciones de bases, *RFLPs* (*Restriction Fragment Length Polimorphism*) o número de repeticiones de microsatélites.

En el caso de los haplotipos mitocondriales, las secuencias de una muestra determinada se comparan dos a dos y se calcula el número de diferencias. Por lo tanto, si existen n secuencias en la muestra será necesaria la realización de $\frac{n \cdot (n - 1)}{2}$ de estas comparaciones. Finalmente se construye un histograma con la frecuencia observada para cada número de diferencias.

Además de describir la diversidad de una muestra, estas distribuciones permiten realizar inferencias acerca de la historia demográfica de las poblaciones. Se ha demostrado que los episodios de crecimiento demográfico, de declive o los cuellos de botella sufridos por una población dejan huellas características en la distribución de las diferencias genéticas por parejas. En general aquellas poblaciones con una distribución gaussiana de las diferencias por parejas del ADNmt han experimentado un período de crecimiento demográfico rápido a partir de una o unas pocas variantes. Por el contrario una distribución asimétrica de las diferencias por parejas es indicadora de una población cuyo tamaño ha sido constante durante largo tiempo (Rogers y Harpending 1992).

1.11.6 El Antepasado Mitocondrial

El primer dato genético que apoyó la teoría del origen africano reciente del hombre y cuestionó seriamente la Hipótesis Multirregional del origen del hombre moderno fue el ADN mitocondrial (ADNmt).

El primer trabajo sobre la variación del genoma mitocondrial en las poblaciones humanas fue llevado a cabo por Westley Brown (1980) y está basado en el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (*RFPLs*). Brown estimó que la diversidad del ADNmt presente en las poblaciones humanas actuales comenzó a acumularse hace 180.000 años, ya que las variantes detectadas diferían de la secuencia ancestral en un

0.18 % de las posiciones descritas y que la tasa de sustitución nucleotídica era de 1 por ciento por cada millón de años.

La filogenia de la variación global del ADNmt fue establecida a partir de estudios posteriores, también basados en RFLPs de baja resolución. El árbol obtenido presentaba una forma en estrella "*starlike tree*" de un único haplotipo central común a todos los individuos de donde surgen los otros haplotipos, de los cuales algunos son específicos de una población.

El haplogrupo (grupo de secuencias que comparten un mismo patrón de mutaciones) central o universal corresponde al antepasado común más reciente de todos los ADNmt del mundo, esto sugiere que todas las poblaciones humanas comparten una historia evolutiva común desde hace mucho tiempo, y podría haber dado apoyo a la idea que el hombre anatómicamente moderno apareció en las diferentes partes del mundo a partir de una población de antepasados comunes arcaicos.

El ADNmt conoció un episodio brillante con un trabajo publicado en 1987 por el equipo de Alian Wilson, dicho artículo tuvo un gran impacto en el mundo científico y repercutió a nivel popular a raíz del debate sobre el origen del hombre moderno y de la Eva mitocondrial africana.

Rebeca Cann, Mark Stoneking y Alian Wilson analizaron RFLPs de alta resolución de una muestra considerable de individuos africanos, asiáticos, australianos, caucasoides y de Nueva Guinea para obtener una filogenia del ADNmt más precisa. Los resultados obtenidos fueron representados en un árbol de máxima parsimonia. El árbol propuesto por Cann presentaba dos ramas: la más profunda presentaba exclusivamente ADNmt africano y la otra ADNmt de las otras cinco poblaciones del resto del mundo. Los autores concluyeron que toda la diversidad del ADNmt provenía de una sola mujer que vivió en África hace 200.000 años, con un margen de error que estaba entre 140.000 y 290.000 años.

Éste resultado fue interpretado con la evidencia del origen reciente africano del hombre moderno. Cann y sus colaboradores nombraron a nuestro antepasado mitocondrial humano como "La Eva mitocondrial". Fue un nombre muy sensacionalista por la prensa escrita y televisiva que hizo una amplia difusión de ésta metáfora. Pero el nombre de Eva creó mucha confusión y fue malinterpretado, ya que evocaba la falsa imagen del *Homo sapiens sapiens* proveniente de una madre única, la madre de todos, y que no había habido ninguna otra mujer antes.

La hipótesis propuesta por Cann, Stoneking y Wilson en 1987, se basaba en el principio de la coalescencia. La coalescencia asume la existencia de un origen común a todos

los organismos. A partir de esta base, se deduce que toda la variación de un segmento de ADN, mitocondrial o nuclear, en las generaciones actuales proviene de un antepasado único.

El antepasado mitocondrial no era el único individuo vivo sino que formaba parte de una población donde el resto de linajes mitocondriales se perdieron en el tiempo. Este antepasado no corresponde a la primera mujer aparecida de nuestra especie, pero sí al punto de partida de todos los linajes mitocondriales actuales.

Este trabajo fue objeto de múltiples críticas:

1. Se estimó que el número de sitios testados por el análisis de RFLPs no era suficiente para aportar una información genealógica robusta.
2. El método utilizado para designar la raíz del árbol que consistía en coger el punto medio de la rama más larga, no era fiable.
3. Se utilizaron individuos afro-americanos en representación de nativos africanos.
4. El árbol presentado en este estudio no era el más parsimonioso y entre los más parsimoniosos algunos no exhibían una clara separación entre las poblaciones africanas y el resto de individuos.
5. El error estándar de la estimación de la divergencia entre los africanos y los no-africanos era tan grande que el tiempo de divergencia podía ser de hasta 800.000 años.

Más tarde, el estudio de Vigilant y colaboradores (1991), confirmaron el origen africano del ADNmt. Además, se utilizaron secuencias de la región de control de chimpancé para calibrar la tasa de evolución del ADNmt, apoyando a Cann et al. (1987).

Estudios posteriores, de otros autores, se basaron en la secuenciación de la región control de algunos genes del ADNmt con tal de reducir el error de la estima del tiempo de divergencia entre africanos y no-africanos. Además se analizaron secuencias del ADNmt de tres especímenes fósiles de Neandertal, éste estudio apoyó el modelo "*Out of África*", ya que los datos indicaban una clara divergencia entre ADNmt Neandertal y de humano moderno y estimó el tiempo de divergencia entre los dos linajes entre 300 y 850 millones de años.

1.11.7 La Interpretación de los Datos Mitocondriales

Existen dos fuentes de error que surgen en el momento de hacer inferencias sobre la genealogía a partir de secuencias. La primera hace referencia al número de posiciones variables y la segunda al número de loci variables.

En un genoma no recombinante, cuanto más largo sea el segmento secuenciado, más precisa es la estima de la distancia evolutiva entre las dos secuencias y, por tanto, más robusta es la genealogía. Los resultados observados cuando se analiza un solo gen (o locus) pueden ser atribuidos, o bien a la propia naturaleza del locus (mutación, selección, migración, deriva, medida poblacional, etc.), o bien reflejan los fenómenos demográficos de la población estudiada.

La otra dificultad que hay que tener en cuenta es la tasa de mutación de las posiciones variables estudiadas. En el caso del ADNmt, la tasa de mutación elevada de la región control conjuntamente con la variación de la tasa de mutación por cada posición variable, comporta la posibilidad de obtener numerosas topologías de árboles igualmente plausibles. Por esta razón, muchas topologías de árboles pueden ser equivalentes y no existe ningún fundamento para decidir cual es la mejor.

El modelo de "*Out of África*" fue defendido principalmente por la raíz africana del árbol de ADNmt). Pero está claro que existen miles de árboles posibles, muchos de los cuales no presentan raíz africana, según otros autores. Para intentar resolver este dilema se desarrollaron nuevas herramientas para analizar los datos basados en el genoma mitocondrial.

Una de ellas es el *network* filogenético que intenta resumir todos los árboles posibles en un gráfico. Watson y colaboradores (1997) aplicaron el método *network* al ADNmt en varias poblaciones africanas. Los resultados obtenidos concuerdan y apoyan a la estructura general del árbol de ADNmt presentado por Vigilant y colaboradores (1991), y también aportaron información complementaria: todos los ADNmt eurasiáticos pertenecían a un solo grupo el origen del cual se encuentra en África.

A partir de este argumento se propuso, siguiendo el modelo "*Out of Africa*", que la población que salió de África para formar la población eurasiática fue suficientemente pequeña como para eliminar todos los tipos de ADNmt excepto uno durante un período de tiempo. Otros autores sugieren que los antepasados de dos tipos de ADNmt sobrevivieron al acontecimiento fundador del "*Out of Africa*". A principios de los años 90, la aplicación del análisis de restricción de alta resolución permitió cubrir del 15 al 20% de la

secuencia de ADNmt y revelaron posiciones polimórficas estables y antiguas de la región no codificante que definen grupos monofiléticos o haplogrupos. Así pues, la caracterización de los haplogrupos aporta la información suficiente para definir las relaciones interpoblacionales y inferir la historia evolutiva de las poblaciones.

Por otra parte, la mayoría de los análisis de la variabilidad del ADNmt se han llevado a cabo mediante secuenciación aplicado al segmento hipervariable I (HVS-I) de la región control. La técnica de secuenciación es adecuada para detectar cualquier tipo de mutación en el ADNmt y es más rápida y sencilla. Aunque la región control tiene una alta tasa de mutación y por tanto es una muy buena herramienta para aplicar sobre secuencias relativamente cercanas y haplogrupos pero podría ser poco resolutiva para construir y resolver filogenias. En consecuencia, los estudios que combinan un análisis conjunto de la región de control (HVS-I) y la región codificante (RFPLs de alta resolución) son decisivos para concluir con precisión haplogrupos y establecer filogenias robustas.

La comparación de los polimorfismos de secuencias de la región de control con los polimorfismos de los fragmentos de restricción analizados de la región codificante, persiguen dos objetivos:

1. Comprobar que hay una buena concordancia entre los dos tipos de polimorfismos.
2. Distinguir entre mutaciones de la región de control antiguas y estables en la genealogía mitocondrial, y por tanto, asociadas a un haplogrupo concreto, de las mutaciones que puedan ser recurrentes.

Tales estudios tuvieron éxito y suministraron esquemas filogenéticos precisos de las poblaciones del oeste de Eurasia y de África sub-sahariana. Aunque el genoma mitocondrial fue uno de los primeros genomas en ser secuenciado en su totalidad, es a partir del año 2000 cuando Ingman y colaboradores analizaron secuencias completas de ADNmt, gracias al progreso de las técnicas y a la existencia de recursos necesarios. El análisis de 53 secuencias completas de ADNmt procedentes de individuos de diferentes regiones del mundo (África, Asia, Europa), que confirmó la raíz africana de la filogenia del ADNmt y las redes filogenéticas obtenidas anteriormente.

Más adelante, Finnilá et al. (2001), basándose en los estudios anteriores, proporcionaron numerosos marcadores para distinguir los diferentes haplogrupos europeos y los diferentes linajes dentro de un mismo haplogrupo. Este trabajo, también, confirmó los resultados obtenidos por los estudios del análisis combinado de las regiones codificante y

control, ya que todas sus secuencias pudieron ser clasificadas dentro de haplogrupos previamente definidos.

1.11.8 Relaciones filogenéticas mitocondriales

La clasificación de los haplogrupos mitocondriales según las posiciones diagnóstico de la región control no es 100% exacta. En varios trabajos realizados aparecieron ambigüedades en la asignación de haplogrupos a los previamente determinados de acuerdo a las mutaciones que presentaba (Macaulay et al. 1999). Ello probablemente viene causado por la retromutación y por la homoplasia en ciertas posiciones. Un análisis de máxima parsimonia de las diferentes filogenias realizadas con las secuencias actuales dio como resultado una gran cantidad de árboles con diferentes topologías, igualmente parsimoniosos, siendo la genealogía irresoluble.

El avance en los estudios de secuenciación de la región hipervariable I (HVSI) reveló que la tasa de mutación es diferencial a lo largo del segmento, con posiciones extremadamente variables unas y relativamente constantes otras. Un determinado cambio nucleotídico puede ser frecuente en una población por dos causas: porque se trate de un cambio ancestral que ha sido heredado por los descendientes de ese linaje; o porque se haya producido de manera independiente en una línea no relacionada. Cualquier análisis filogenético que otorgue el mismo peso a todas las posiciones como el de máxima parsimonia o de diferencias en parejas de nucleótidos, tenderá a agrupar aquellas secuencias que compartan posiciones, creando grupos polifiléticos. Cualquier interpretación evolutiva derivada de estas agrupaciones será, pues, cuestionable. De manera análoga, si una misma posición ha mutado varias veces en la evolución puede resultar difícil, si no imposible, determinar el estatus ancestral del haplotipo. La filogenia, en estos casos, debería separar variantes estrechamente relacionadas.

Fue necesario, entonces, el desarrollo de nuevas herramientas específicas para el análisis poblacional de este peculiar material genético. La aproximación de mayor éxito fue la Bandelt et al. 1995. Este método de reconstrucción filogenética denominado “Método de las redes medias” o “*Median Networks*” permite resumir los árboles más parsimoniosos de un grupo de datos en forma de una única red, e informa, además, acerca de la frecuencia de cada haplotipo observado. En este tipo de reconstrucción se identifican las sustituciones

homoplásicas y se presentan en forma de puntos reticulares, lo que facilita su interpretación evolutiva.

Cuando el número de haplotipos diferentes es muy elevado, las reticulaciones pueden aumentar hasta hacer el árbol ininteligible. En este caso se suelen eliminar los haplotipos menos frecuentes, partiendo de la asunción que son los que se han generado más recientemente (Richards et al, 1998). Otra estrategia válida consiste en identificar las posiciones causantes de las reticulaciones y otorgarles un peso bajo, considerando que se trata de sitios hipermutables. Un método alternativo para la construcción de *networks* con pocas reticulaciones es el *Median Joining* (Bandelt et. al, 1999), que consiste en la introducción de los nodos ancestrales más probables en la red de secuencias observadas.

1.12 El ADN del cromosoma Y

El cromosoma Y es un cromosoma acrocéntrico de pequeño tamaño que tiene aproximadamente 60 Mb (Skaletsky et al. 2003). Consta de 2 tipos de regiones, una región no recombinante y otra región pseudoautosómica. La región no recombinante, también denominada *Non-Recombining Region (NRY)*, *Nonrecombining Portion of the Y (NRPY)*, ocupa el 95% del cromosoma Y (8 Mb en el brazo corto del cromosoma Y y 14,5 Mb en el brazo largo). En un principio, y al no tener homólogo, en esta región no podría haber recombinación durante la meiosis. En dicha región hay un mosaico de secuencias heterocromáticas y 3 clases de secuencias eucromáticas:

1. Transposón del cromosoma X (X-transposed)
2. Segmentos degenerados del cromosoma X (X-degenerate)
3. Amplicones (ampliconic) (Skaletsky et al, 2003).

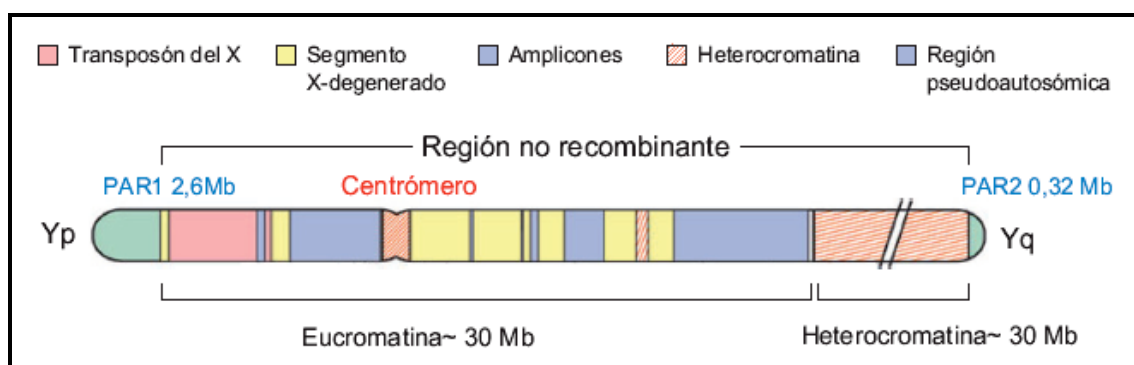


Fig.40 Estructura del cromosoma Y, (Arroyo et al, 2010)

La zona eucromática con 23 Mb codifica para 27 proteínas diferentes con una media de 1,2 genes por Mb (Skaletsky et al. 2003; Jobling et al. 2004), lo cual resulta pobre comparado con los 717 genes en 160 Mb del cromosoma X (4,5 genes/Mb) (Jobling et al. 2004). La zona heterocromática suele ser variable en longitud, aunque típicamente contiene 30 Mb (Jobling et al. 2004). Esta región se localiza fundamentalmente en el brazo largo del cromosoma Y, aunque también presenta un bloque en el centrómero de aproximadamente 1 Mb (Venter et al. 2001; Skaletsky et al. 2003) y un pequeño bloque de 400 Kb, que interrumpe la región eucromática.

Según algunos investigadores, como Skaletsky, el nombre correcto para esta región sería *Male-Specific Region* (MSY) ya que es una región específica de los varones y presenta recombinación. Así, según Skaletsky et al. (2003), la coincidencia nucleotídica intracromosómica del 99,9 al 100% en el 30% de la zona eucromática daría prueba de fenómenos de recombinación no recíproca o conversión génica. Además, los procesos de conversión génica dentro del propio cromosoma Y contrarrestarían la degeneración causada por la ausencia de recombinación con otros cromosomas, pasando a ser un mecanismo de protección del propio cromosoma (Rozen et al. 2003).

Flanqueando la región no recombinante se localizan 2 regiones pseudoautosómicas: PAR I y PAR II, que pueden recombinar con el cromosoma X. PAR I (región pseudoautosómica I) con 2,6 Mb, que se encuentra en el extremo del brazo corto de los cromosomas X e Y, y es una región de obligada recombinación durante la meiosis masculina (Jobling et al. 2004). PAR II (región pseudoautosómica II) con 0,32 Mb, que se encuentra en el extremo del brazo largo de los cromosomas X e Y, sería una adquisición evolutivamente más reciente, específica de humanos, y con poca importancia en la segregación cromosómica (Jobling et al. 2004).

En contraste con su escasa dotación de genes, el cromosoma Y es rico en diferentes tipos de repeticiones como SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*), retrovirus endógenos y duplicaciones. Ello provoca una mayor susceptibilidad a reordenamientos por recombinación entre homólogos no alélicos con resultado de inusuales altos niveles de polimorfismos estructurales entre humanos (Jobling et al. 2004). El cromosoma Y se caracteriza por presentar una gran proporción de duplicaciones de segmentos (Skaletsky et al. 2003); variaciones en la longitud de los segmentos de eucromatina y heterocromatina (Bobrow et al. 1971); inversiones (Verma et al. 1982) y translocaciones neutrales con cromosomas autosómicos, deleciones (Jobling et al. 2007), etc.

La elección de los polimorfismos del cromosoma Y presentes en NRY en el análisis de la estructura genética de las poblaciones humanas se basa fundamentalmente en tres de estas propiedades: está presente exclusivamente en varones, localizado en un cromosoma que no tiene homólogo y no presenta recombinación (Jobling et al. 1996). Estas propiedades tienen como consecuencia que el cromosoma Y se hereda de padres a hijos varones sin cambios excepto por las mutaciones que gradualmente se van acumulando, y que permiten estudiar la historia genética de las poblaciones o los individuos.

Desde el descubrimiento del primer polimorfismo de ADN en cromosoma Y en 1985 el número y tipo de marcadores se ha incrementado exponencialmente. Los tipos de polimorfismos que con más frecuencia se han utilizado son: sustituciones de una base, duplicaciones o deleciones, inserciones, organizaciones complejas y VNTRS (*Variable Number of Tandem Repeats*). Dentro de este grupo de polimorfismos los más analizados en la actualidad son los microsatélites y polimorfismos basados en el cambio de una base.

1.12.1 Microsatélites del cromosoma Y

El descubrimiento y empleo de microsatélites de utilidad forense ha ido paralelamente al uso de esos mismos polimorfismos en el estudio de la filogenia de las poblaciones humanas. Así, en 1997 la comunidad forense europea propuso un conjunto de 8 loci estandarizados que permitiera comparar estudios entre sí realizados en distintos laboratorios y que se denomina coloquialmente como “haplotipo mínimo”. Por haplotipo se entiende una combinación de alelos de diferentes loci. El mencionado haplotipo mínimo consta de los sistemas DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 y DYS385 (de Knijff et al. 1997; Roewer et al. 2001).

Actualmente, la mayor parte los estudios en genética de poblaciones humana, genética forense, bases de datos y kits comerciales incluyen los sistemas correspondientes al haplotipo mínimo. Posteriormente al haplotipo mínimo se han añadido sistemas como DYS438 y DYS439, que han originado lo que se conoce como “haplotipo extendido”.

En general, resulta de gran utilidad conocer las tasas de mutación de los polimorfismos STRs, ya que este dato permite inferir filogenias y conocer si una población lleva mucho tiempo divergiendo filogenéticamente. Las tasas de mutación se han estimado examinando descendientes de genealogías que están separados por muchas generaciones, o bien utilizando líneas celulares, o el análisis directo de mutaciones en padres e hijos de

paternidad confirmada (probabilidad 99.9%); o bien recurriendo a técnicas menos habituales como el análisis en esperma. Además también pueden estimarse a partir del número de mutaciones en las ramas de un *network* de haplotipos de una población o dentro de haplogrupos definidos por SNPs.

De todos estos trabajos, ha podido deducirse la regla general de que la tasa de mutación tiende a mantener un cierto equilibrio en la longitud del polimorfismo. Dicho de otra manera, los bloques de unidades de repetición más largos tienden a contraerse mientras que los bloques de unidades de repetición más cortos tienden a expandirse. Según ha podido observarse, a partir de cierto número de repeticiones la tasa de contracción mutacional incrementa. No obstante, el fenómeno de mutación no varía con el locus y el tipo de repetición, por lo que las tasas de mutación alélica son específicas.

1.12.2 Marcadores bialélicos del cromosoma Y

Hasta 1997 solo existían 11 marcadores bialélicos descritos en el cromosoma Y, en su totalidad fácilmente determinables mediante PCR. Debe aclararse que el polimorfismo es decir, sus dos alelos, podía radicar tanto en el cambio de una base por otra como en la delección o la inserción de una secuencia.

En 1997 se publicaron 19 nuevos polimorfismos bialélicos identificados mediante la aplicación de la técnica de DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Condiciones Desnaturalizantes) (Underhill et al. 1997). Este hallazgo posibilitó el aumento exponencial de nuevos SNPs, inserciones y delecciones (*Y-chromosome Consortium, 2002*).

La particularidad principal de los SNPs es que sus tasas de mutación son mucho más bajas que las de los STRs (10⁻⁸ frente a 10⁻³ mutaciones por generación). Pese a que existen evidencias de recurrencia, como sucede en SRY-1532, éstas son poco frecuentes.

En el campo de identificación los SNPs del cromosoma Y son de gran interés debido al carácter de marcador de linajes del cromosoma Y, y su baja tasa de mutación. Así la información conjunta de microsatélites permite no sólo llevar a cabo identificaciones, sino según el haplogrupo, poder asignarle un origen geográfico.

1.12.3 Importancia poblacional de los polimorfismos del cromosoma Y

Actualmente, no hay duda sobre la importancia poblacional y filogenética de los polimorfismos Y-STRs e Y-SNPs. Los Y-STRs presentan una alta variabilidad, tanto individual como poblacional, y sus características les hacen especialmente útiles en el análisis de la diversidad genética de las poblaciones humanas dentro de una profundidad temporal de a lo sumo unos cientos de años. A este respecto, en la actualidad se dispone de un gran volumen de datos referentes a muestras procedentes de muchos países que están permitiendo profundizar en el conocimiento de las variaciones genéticas de grupos actuales.

En los últimos años, se ha propuesto un árbol filogenético de los haplogrupos binarios a partir de los 245 Y-SNPs disponibles, descritos en la literatura (YCC 2002). A partir de ese árbol se ha propuesto un análisis jerárquico que selecciona 30 de los 245 Y-SNPs descritos por el “*Y Chromosome Consortium*” (YCC, 2002), a fin de determinar los haplogrupos más comunes en poblaciones europeas (Brion et al. 2005). Con fecha aún más reciente, se ha propuesto un nuevo árbol jerárquico de Y-SNPs que añade además una nueva nomenclatura en algunos casos (Karafet et al. 2008).

Por todo lo que antecede, existe un acuerdo general sobre la utilidad de los polimorfismos de cromosoma Y como herramienta para la reconstrucción de la historia genética de las poblaciones humanas.

1.13 El ADN autosómico

Los marcadores genéticos autosómicos son los localizados en los 22 pares de cromosomas no sexuales también llamados autosomas. Entre la gran diversidad de marcadores, consideraremos brevemente los llamados microsatélites, los más empleados, junto con los SNPs (*Single Nucleotide Polimorphisms*). Entre las ventajas que han provocado el uso masivo de estos marcadores, sobre todo en Antropología Forense, pueden destacarse las siguientes (Arroyo-Pardo et al. 2010):

1. Elevado polimorfismo, causado por altas tasas de mutación. Respecto a otros marcadores presentan muchas variantes o alelos.
2. Sencillez de amplificación y de detección. Ordinariamente se amplifican de 15 a 17 marcadores en una sola reacción de PCR.

3. Gran capacidad de discriminación y, por tanto, de gran utilidad en la identificación personal cuando se combinan en número suficiente.
4. Fácil construcción de bases de datos de referencia.
5. En proporción al resultado, bajo coste económico.

Los sistemas o marcadores genéticos empleados en la mayoría de los laboratorios han sido consensuados internacionalmente por diversos organismos con competencias en materia de Antropología Forense, como la AAFS (*American Academy of Forensic Sciences*) o la ISFG (*Internacional Society of Forensic Genetics*). El CODIS (*Combined ADN Index System*), desarrollado por el FBI a finales de los 90, incluye 13 sistemas de STRs tetraméricos, utilizados por la mayoría de laboratorios forenses, sin óbice de que se añadan otros marcadores más. Todos estos sistemas se suelen amplificar mediante kits comerciales (*Promega, Applied Biosystems*) en una sola reacción de PCR o multiplex.

Los perfiles genéticos obtenidos mediante el análisis simultáneo de un número significativo (10-17) de regiones STRs en los cromosomas autosómicos permiten un elevado poder de discriminación individual, alcanzándose índices de identificación en los que la frecuencia de aparición por azar del perfil en la población es tan baja (por encima de 1 en un billón) que es teóricamente imposible (en una población real de 6.000 millones) la existencia de un segundo individuo no relacionado genéticamente con el mismo perfil de ADN.

Otra característica de su gran poder de discriminación de los microsatélites es la alta posibilidad de localizar regiones con nulo desequilibrio de ligamiento, lo que significa un patrón de herencia independiente y altos índices de identificación.

1.13.1 Los STR's (*Short tandem repeats*)

Los microsatélites o STR's (*Short Tandem Repeats*) se caracterizan por la repetición en tandem de 2 a 6 pares de bases.

Los STR's se descubrieron a mediados de los años ochenta y se utilizan en estudios de genética de poblaciones humanas debido a una serie de características:

1. Son marcadores que no están sujetos a la selección natural.
2. Son abundantes en el genoma, presentan una elevada heterozigosidad y por la tanto son altamente informativos.

3. Presentan una tasa de mutación alta que depende sobretodo de la longitud de la unidad y del numero de repeticiones, de forma que cuantas más repeticiones presenta el fragmento más alta es la tasa de mutación.

Estas propiedades hacen que los microsatélites sean especialmente útiles para la identificación individual en las ciencias forenses así como la detección de sucesos demográficos recientes.

Los microsatélites se clasifican según el número de nucleótidos de la unidad básica de repetición, recibiendo el nombre de dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos, etc. Esta es la clasificación más utilizada pero existen otras basadas en la complejidad de la repetición (repeticiones imperfectas, perfectas, complejas).

El patrón generador de la diversidad o de aparición de nuevas mutaciones en los microsatélites más aceptado por la comunidad científica deriva de procesos *strand slippage*, propuesto por Di Rienzo et al. (1994). Estos procesos ocurren cuando se produce un mal apareamiento de la cadena de ADN *template* con la nueva cadena sintetizada durante el proceso de replicación del ADN.

Los marcadores genéticos de tipo microsatélite se han utilizado en muchas disciplinas de la genética. Por ejemplo, son importantes en medicina legal con el propósito de la identificación individual y para elaborar tests de paternidad (Blouin et al. 1996). Los microsatélites también se han utilizado en genética humana tanto para estudios de ligamiento en los cuales se quiere determinar la posición exacta de genes relacionados con enfermedades de componente genético (Dib et al. 1996) como para estudios de asociación con enfermedades complejas.

Desde de un punto de vista de la genética de poblaciones, los STR's se han utilizado para la reconstrucción de la historia de las poblaciones humanas y de las relaciones filogenéticas entre éstas, (Deka et al. 1995, Jorde et al. 1997, Gené et al 1998, 2000, Aida et al. 2003, Esteban 2005, Corella et al. 2008)

La elevada tasa mutacional de los STR's puede ser un obstáculo en los estudios de genética de poblaciones y a la hora de elaborar filogenias ya que no es posible asegurar la identidad por descendencia de todos los cromosomas que presentan un mismo alelo. Por esta razón, se trata de caracteres que no estan libres de homoplasia. (al contrario de las inserciones Alu)

1.13.2 STR's utilizados

- HUMTH01

Denominado también TC11 (acceso: D00269. GenBank: http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_TH01.htm): Se trata de un polimorfismo STR simple con alelos no-consenso del tipo tetranucleótido (Edwards y cols., 1991; Wiegand y cols., 1993). Está localizado en el intrón 1 del gen de la enzima tirosín-hidroxilasa humana, dentro del cromosoma 11 (banda 11p15-p15.5). El núcleo de repetición es (AATG)_n y en la mayoría de las poblaciones caucasoides posee 7 alelos comunes (5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10) aunque se han descrito otros alelos (3, 8.3, 10.3, 11, 12 y 13.3). Algunos presentan una microvariación en longitud (8.3, 9.3, 10.3 y 13.3)

- HUMTPOX

Denominado también hTPO (acceso: M68651. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido (Edwards y cols., 1991; Anker y cols., 1992) que está localizado en el intrón 10 del gen de la tiro-peroxidasa dentro del cromosoma 2 (banda 2p23-2pter). La unidad de repetición es (AATG)_n y se han descrito nueve alelos que incluyen de 6 a 14 repeticiones.

- HUMCSF1PO

Denominado también CSF (acceso: X14720. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de otro polimorfismo STR simple con alelos no-consenso del tipo tetranucleótido (Hammond y Caskey, 1992; Puers y cols., 1993). Está localizado en el proto-oncogen c-fms para el gen del receptor CSF-1, dentro del cromosoma 5 (banda 5q33.3-34). La unidad de repetición es (AGAT)_n y se han descrito 11 alelos (6, 7, 8, 9, 10, 10.3, 11, 12, 13, 14 y 15) (Puers y cols., 1993).

- HUMVWA31A

También denominado vWF y VWA31A (acceso: M25858. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR compuesto con alelos no-consenso del tipo tetranucleótido (Kimpton y cols., 1992; Möller y cols., 1994). Está localizado en gen del factor von Willebrand, dentro del cromosoma 12 (banda 12p12-

pter). La unidad de repetición es (TCTA) con inserciones (TCTG) y (TCCA) y presenta 18 alelos algunos de ellos de igual longitud pero diferente secuencia y un alelo con microvariación en longitud (11, 12, dos alelos 13, dos alelos 14, dos alelos 15, 15.2, dos alelos 16, 17, dos alelos 18, 19, 20, 21 y 22).

- D3S1358

Se trata de un STR compuesto con alelos noconsenso del tipo tetranucleótido (Li y cols., 1993), (acceso: GDB: 196594; The Genome Database: <http://gdbwww.gdb.org/>): Está localizado en el cromosoma 3 (brazo 3p). La estructura de la unidad de repetición es (TCTG)_n (TCTA)_n y presenta 13 alelos con microvariaciones de longitud (9, 11, 12, 13, 14, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 18, 19 y 20).

- D8S1179

Está localizado en el cromosoma 8. La unidad de repetición es (TATC)_n y presenta 12 alelos con 8 a 19 repeticiones. (acceso: G08710. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido (Sheffield y cols., 1995; Barber y Parkin, 1995).

- HLA DQ-alfa

Gen polimórfico de la región del antígeno del leucocito humano (HLA) del cromosoma 6.

- D18S51

Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido con alelos no-consenso (Barber y Parkin, 1995), (acceso: X91254 y L18333. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se encuentra localizado en el cromosoma 18 (banda 18q21.3). La unidad de repetición es (AGAA)_n y presenta 21 alelos, algunos de ellos con microvariación de longitud (8, 9, 10, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 17, 17.2, 18, 19, 19.2, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27)

- YNZ22

También llamado D17S5, es un VNTR muy polimórfico localizado en el cromosoma 17

- D19S253

Polimorfismo simple del tipo tetranucleótido (Weber et al. 1993) Está localizado en el cromosoma 19 (banda 19p13.12) la unidad repetida es GATA y presenta 9 alelos con 7 a 15 repeticiones.

1.14 Marcadores genéticos y filogenia humana

La Antropología Biológica, la Paleontología y la Arqueología son las disciplinas científicas que más directamente aportan información sobre nuestro origen. Si bien el estudio de los fósiles ha sido la herramienta básica en el estudio del pasado humano, la reconstrucción de este pasado complejo y perlongado en el tiempo, se lleva a cabo desde hace ya algunos años con ayuda de otras ciencias.

La Antropología Molecular ha resultado ser una fuente amplia y útil de información científica, particularmente en la investigación del ADN. Las secuencias de ADN, mitocondrial y autosómico contienen polimorfismos que permiten reconstruir, en parte, la historia de las poblaciones de nuestra especie. Los marcadores genéticos más utilizados hoy día en la reconstrucción de la filogenia reciente humana son los polimorfismos de ADN mitocondrial (ADNmt) y los de la región no recombinante del Cromosoma Y (NRY). Los datos disponibles de este último marcador no autosómico son relativamente escasos. Sin embargo esta situación ha cambiado tras la publicación reciente de los resultados del consorcio Pan-Asiático SNP que ha analizado aproximadamente 54,794 SNPs en 1928 individuos de 73 poblaciones asiáticas (Li et al. 2009) y que observa una gran correlación entre la genética, la lengua y la geografía en los grupos humanos asiáticos, así mismo la publicación sugiere que las poblaciones del Sudeste asiático contribuyeron genéticamente en muchas de las poblaciones que encontramos actualmente en el Este de Asia.

Por otro lado, la variación ADNmt de 74 individuos de lengua Khoisan (Kung y Khwe) procedentes de Schmidtsdrift, cerca de Bloemfontein, en Sudáfrica apunta a un origen africano de la Humanidad actual que coincide con otras evidencias, paleontológicas, arqueológicas lingüísticas y genéticas.

1.14.1 Filogenia del ADN mitocondrial

El estudio de los haplotipos mediante las secuencias de la Región de Control (RC) y de enzimas de restricción (RFPLs: *Restriction Fragment Length Polimorphism*) de alta resolución en el resto del ADNmt revelan que más del 77 % del Kung y Khwe pertenecían a un macro-haplogrupo llamado L (definido por un HpaI ubicado en la posición nucleotídica 3592), que también está presente en otras poblaciones subsaharianas. Estudios adicionales de RFLPS subdividieron el macrohaplogrupo L en dos nuevos subhaplogrupos denominados L1 y L2.



Fig.41 Origen y distribución geográfica y temporal de los distintos haplogrupos de ADN mitocondrial

Estos haplogrupos, también presentes en los Kung y los Khwe, son presentes también en la población pigmea Biaka. Los datos revelaron que los pigmeos Biaka poseen uno de los sublinajes de ADNmt determinado por RFLPs más antiguo de toda la humanidad. Nuevas comparaciones mostraron que los Kung junto con los Khwe y los mencionados pigmeos se sitúan en la raíz del árbol mitocondrial humano. Según las secuencias de la región de control del ADNmt los Kung se asocian a otros pueblos de habla Khoisan mientras que los Khwe están vinculados a los de habla Bantú. Finalmente, la divergencia de secuencia total de 214 haplotipos hallados permitieron calcular una fecha de diferenciación, para todo el ADNmt africano, estimada en 125,500-165,500 años antes del presente, una fecha que es concordante con todas las estimaciones anteriores basadas en ADNmt y otros datos genéticos que han

pretendido establecer una fecha para diferenciación de los humanos actuales (Chen et al. 2000).

Si nos referimos al estudio de RFLPs mitocondriales, en América, los haplogrupos A, B, C y D fueron los primeros haplogrupos asiáticos reconocidos entre las poblaciones nativas de América (Torroni et al. 1992; Torroni et al. 1993). Posteriormente se mostró que los haplogrupos C y D comparten un antecesor reciente con el haplogrupo M, mientras que A y B colascen con el nodo común N, de esta manera la variación del ADN mitocondrial de las poblaciones actuales pueden clasificarse en dos macro clusters. Los haplogrupos M y N colascen con el macro haplogrupo africano L3.

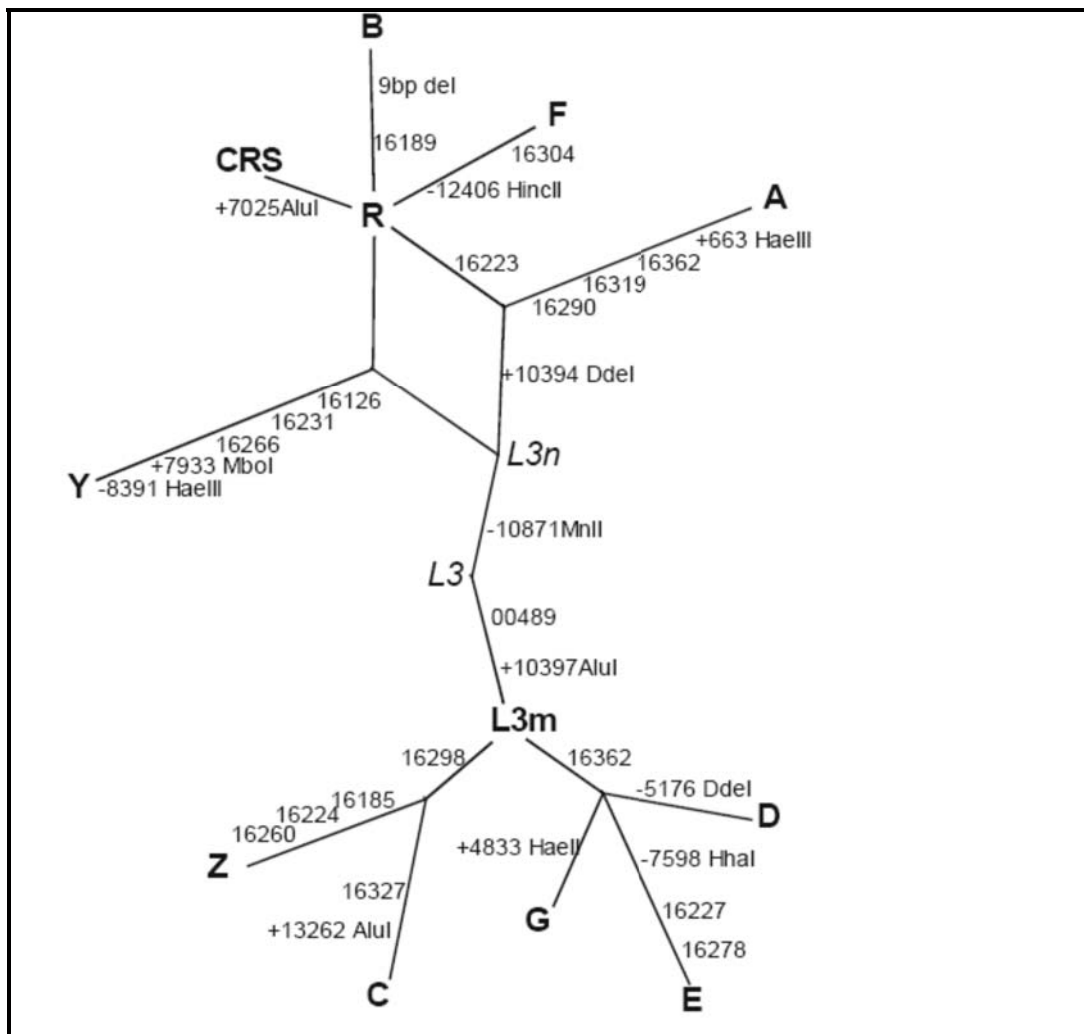


Fig. 42 Haplogrupos de ADN mitocondrial de poblaciones asiáticas, una síntesis de Ballinger et al. 1992; Torroni et al. 1994, Schurr et al. 1999 y Quintana-Murci et al. 1999. Cada haplogrupo está separado por una secuencia o un polimorfismo de una enzima de restricción en las posiciones nucleotídicas mostradas en las ramas. La variación en la HVRII no está incluida. Sólo en caso de transversiones el cambio del nucleótido se incluye. La polaridad de los lugares RLFP se muestra comparada a CRS. Las etiquetas de los supergrupos intermedios se muestran en cursiva.

En 1990, Schurr et al. examinando secuencias de ADNmt de tres poblaciones Amerindias: Ticuna, Maya y Pima identificó los cuatro haplogrupos en cada población.

El haplogrupo A fue definido por contener un *HaeIII* en posición nucleotídica 663. Este cluster puede ser dividido en dos subclusters dependiendo de la presencia o ausencia de *HaeIII* en la posición nucleotídica 16517. Algunas secuencias Na-Dene pero ninguna de las Amerindias exhibieron una pérdida de un *RsaI* en posición 16329, marcando este punto como un marcador genético específico para la población Na-Dene.

El clúster B fue caracterizado por un *HaeIII* en posición 16517 y por una delección de 9-pb. Esta delección (CCCCCTCTA) ocurría en la región V en una corta región no codificante ubicada entre los genes para la citocromo c oxidasa subunidad II (COII) y tRNA^{Lys} en (8272-8280 o 8281-8289) (Wrischnik et al, 1987).

El clúster C fue definido por una pérdida de un *HincII* en la posición 13259 y la ganancia de un *AluI* en la posición 13262.

El clúster D fue caracterizado por la pérdida de un *AluI* en la posición nucleotídica 5176.

Las evidencias arqueológicas sugieren que los fundadores de las poblaciones nativas de América migraron desde Siberia a través del estrecho de Bering. Las relaciones entre el ADNmt de las poblaciones asiáticas de Siberia y las Americanas dio información adicional sobre el tiempo y la dinámica de esas migraciones. Uno de los primeros científicos en investigar el parentivo del ADN mitocondrial fue Torroni el cual estudio 400 aborígenes del norte de Siberia y del este de Rusia (Torroni et al. 1993).

Los únicos haplogrupos que contenían dichas poblaciones era los A, C y D. El haplogrupo A representaba el 15,3% del total y todas las poblaciones Siberianas con el haplogrupo A exhibían el característico *HaeIII* 663 pero sólo el 3,2% tenían el *HaeIII* 16517. Con este resultado los autores sugirieron que el haplogrupo A Amerindio sólo contenía la posición *HaeIII* 663. Otro resultado remarcable de este estudio fue que todas las secuencias Siberianas del haplogrupo A tenían las mutaciones características 16290 C y 16319 A.

Estudios del ADNmt en el este de Asia han aportado mucha información acerca de la evolución del haplogrupo A (Ingman et al. 2000; Kivisild et al 2002; Kong et al. 2003; Bandelt et al. 2003; Mishmar et al. 2003; Jin et al. 2006). Por ejemplo, todas las mutaciones características del haplogrupo A que distinguieron el Súperhaplogrupo N del haplogrupo A, aparecieron hace unos 50,000 años: en el caso de la región hypervariable I +/-16111T, 16223T, 16290T, 16319A, 16362C.

El haplogrupo C (+13262 *AluI*; HVS-I 16223-16298-16327) está ampliamente distribuido en las poblaciones del norte de Asia, la distribución geográfica se extiende desde Asia central hasta la península de Kamchatka y Japón. La frecuencia de dicho haplogrupo es muy alta entre las poblaciones Evenk (84.3%) y Yukaghirs (59.3%) (Torrioni et al. 1993b) y muy baja en las poblaciones del sudeste asiático (grupo R en Ballinger et al. 1992), C es uno de los cuatro haplogrupos básicos del ADNmt de las poblaciones nativas de América (Torrioni et al. 1993b). Éste haplogrupo se caracteriza porque tiene una transición en la posición 16325 (Forster et al. 1996). La cual, ocasionalmente ha sido descrita en poblaciones asiáticas (Comas et al. 1998; Horai et al. 1996; Kolman et al. 1996).

El haplogrupo D (-5176 *AluI*; HVS-I 16223-16362) reveló también una fuerte diferencia de distribución de la frecuencia entre el sur y el norte en poblaciones del este de Asia. Similarmente al haplogrupo C está ampliamente distribuido en Asia central y en las poblaciones de Siberia pero se encuentra en frecuencias bajas en poblaciones del sudeste asiático. En las poblaciones Amerindias, el haplogrupo D es más frecuente en las poblaciones sudamerindias.

El haplogrupo B (9-bp deletion between *COII* and *tRNALys*, HVS-I 16189) es común en poblaciones centrales y del sudeste asiático alcanzando valores muy altos en poblaciones de Oceanía. (Ballinger et al. 1992; Hertzberg et al. 1989; Lum et al. 1998; Melton et al. 1995; Redd et al. 1995; Stoneking et al. 1990; Sykes et al. 1995). El haplogrupo B también está presente en Nativos americanos (Torrioni et al. 1993a; Torrioni et al. 1992). El hecho de que este ausente en poblaciones siberianas hizo que se especulara que la delección de 9-pb pudiese haber llegado a América a través de migraciones posteriores a las de los otros haplogrupos (Torrioni et al. 1994; Torrioni et al. 1993; Torrioni et al. 1992) desde el Este de Asia o a través de migraciones provenientes del Pacífico (Cann, 1994). Pero posteriormente se demostró que el haplogrupo B de poblaciones Amerindias y Polinesias son diferentes (Bonatto et al. 1996), además se ha encontrado dicho haplogrupo en poblaciones siberianas como los Tuvinians y los Buryats (Derenko et al. 1999).

1.14.2 Filogenia del cromosoma Y

En el cromosoma Y, por otra parte, un estudio de la variación de 77 posiciones bialélicas, localizadas en la parte no-recombinante del cromosoma Y, examinada en 608 varones de 22 poblaciones africanas, mostró una distribución no uniforme en África. El análisis de la varianza molecular descubrió un nivel alto de diversidad interpoblacional, parcialmente asociado con la geografía. En África subsahariana la expansión de determinados haplotipos borró parcialmente la diversidad preexistente. El análisis de correspondencias ha mostrado tres subconjuntos para estos marcadores del Cromosoma Y: africanos del norte, del Este, y los sub-saharianos. Los Khoisan, los pigmeos así como algunas poblaciones del norte del Camerún, se diferencian del resto.



Fig. 43 Origen y distribución geográfica y temporal de los haplogrupos del ADN del cromosoma Y.

El análisis filogenético-geográfico indica que buena parte de los actuales Khoisan constituyen la base génica del África del Este, y que Asia es el origen de una nueva migración que regresó a la África subsahariana; los cromosomas Y del Haplogrupo IX distinguen esta migración de regreso a África, cuyas trazas se detectan actualmente en todo el norte del Camerún (Cruciani et al. 2002).

En resumen, los análisis de ADNmt muestran que hay dos líneas casi exclusivamente africanas: los haplogrupos L1 y L2. El haplogrupo L1 es el más antiguo (130.000 años) y contiene la raíz de la filogenia mundial de ADNmt (Forster, 2004). Algunas líneas de este clado son hoy exclusivas de ciertas regiones geográficas. Así las líneas L1d y L1k aparecen

en grupos bosquimanos de África del Sur, el clado L1c se localiza en África Central y del Oeste y los clados L1e y L1f en ciertas poblaciones de África del Este (Watson et al. 1997). Los haplogrupos más ampliamente distribuidos y predominantes en África son L2 y L3. Habrían surgido en África, entre hace 80.000 y 60.000 años, y se expandieron por todo el continente a las líneas L1 preexistentes. Fuera de África los linajes del ADNmt se engloban en dos grandes super-clusters M y N, derivados del haplogrupo L3, que reúnen el resto de haplogrupos mundiales. Ello ha llevado a muchos autores a hipotetizar que la expansión desde África estuvo formada esencialmente por portadores del haplogrupo L3 los cuales se habrían diferenciado después en M y N, dentro o fuera del continente africano. Los haplogrupos M y N se expandieron por toda Europa y Asia diversificándose y dando lugar a variantes específicas de cada continente. M dio lugar a la mayoría de haplogrupos asiáticos: C, D, E, G, Z y Q, y N a los europeos y algún asiático: A, I, W, X, Y, P, B, F, H, U y JT. Hace aproximadamente 25.000 años una o varias migraciones llegaron a América, a través del estrecho de Bering, llevando consigo los haplogrupos A, B, C y D al continente americano.

El estudio de otro marcador haploide, el Cromosoma Y, ha proporcionado un panorama muy similar. En la filogenia reconstruida a partir de marcadores binarios de la porción no recombinante de este cromosoma se distinguen dos líneas predominantemente africanas (A y B). El resto de variantes, tanto en África como fuera de ella, comparten dos sustituciones características (M168 y P9) que se han relacionado con las líneas que abandonaron África y poblaron Eurasia. Estas líneas se subdividen en tres: C, D, E y F, siendo el último grupo el más ampliamente distribuido fuera de África (*Y chromosome consortium 2002*).

Las fechas para la separación entre las líneas estrictamente africanas y aquellas distribuidas por el resto del mundo obtenidas a partir de las filogenias de estos dos marcadores teniendo en cuenta los intervalos de confianza, son consistentes y permiten situar dicha separación hace entre 40.000 y 60.000 años.

En Asia del Este hay rastro de *Homo erectus* que se remonta al menos a 1.6 millón de años (Chiocon y Bettis 2009). Sin embargo, por lo observado hoy día, lo más probables es que las poblaciones modernas humanas en Asia de Este, y de otras partes del planeta, descendan de migraciones de gente moderna de África que, hace aproximadamente 50-70 mil años, ocuparon Asia por rutas del sur o del norte.

Posteriormente hubo otras migraciones desde Eurasia occidental como las de 12000 y 1000 a.C., respectivamente y por las Ruta de la Seda de hace unos mil años (Comas et al. 1998; Wells et al. 2001). En sentido oeste-este desde Siberia del sur se ocupó en Europa del Este hace aproximadamente 12-14 mil años (Rootsi et al. 2007), así como una expansión de Sino-Tibetanos hacia la India del noreste (Cordeaux et al. 2004; Su et al. 2000). La colonización del Nuevo Mundo vía Estrecho de Bering se dio, al menos, hace 15 mil años (Fagundes et al. 2008); y el poblamiento austronesio comenzó hace unos 6 mil años desde la isla de Taiwan por Filipinas y Indonesia, alcanzando el litoral de Melanesia, la Micronesia, Polinesia, y, en sentido geográfico contrario, hasta Madagascar (Melton et al. 1998, Trejaut et al. 2005; Hurler et al. 2005; Mona et al. 2009).

Existe consenso en aceptar que América es el continente más recientemente poblado por el hombre y que la vía principal de entrada fue Beringia. Sin embargo, cuándo, cómo y por dónde, son cuestiones vehementemente disputadas. En las poblaciones amerindias actuales sólo se caracterizan por tener casi exclusivamente cinco haplogrupos mitocondriales; A, B, C, D y X. Los cuatro primeros haplogrupos son de origen asiático. Sin embargo, (Fagundes et al. 2008) analizando el modelo diferencial de distribución de estos linajes así como la frecuencia de haplogrupo X, ha propuesto una única migración Pre-Clovis independiente en América.

Fagundes et al. han intentado refutar el modelo de migración múltiple en América analizando 86 genomas mitocondriales completos así como la historia demográfica que de ellos se deduce. Según estos autores, la diferenciación inicial sucedió con un cuello de botella moderado en algunas poblaciones asiáticas que habitaban Beringia durante el Último Máximo Glacial (UGM), hace entre ~23,000 y ~19,000 años. Hacia el final del UGM, dichas poblaciones, según el modelo de coalescencia utilizado, experimentaron un fuerte crecimiento demográfico que comenzó hace ~18,000 y terminó hace ~15,000 años. Estos resultados apuntan según los autores hacia la colonización Pre-Clovis del Nuevo Mundo, y a una ocupación rápida del continente a lo largo de la ruta costera del Pacífico.

1.15 Tratamiento estadístico

En este apartado describiré los diferentes métodos estadísticos utilizados a partir de los datos genéticos del ADN mitocondrial (ADNmt), análisis de STR's y del cromosoma Y. Los parámetros estadísticos de variabilidad genética intrapoblacional como la diversidad haplotípica, la nucleotídica, la mediana de *pairwise differences* se han calculado utilizando los programas Arlequín versión 2000 (Schneider et al. 2000) i Mega 2.1 (Kumar et al. 2001),

1.15.1 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) y $\hat{\theta}$ de Weir

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) permite estimar la diferenciación genética dentro de poblaciones, entre poblaciones pertenecientes a un mismo grupo o cluster y testar hipótesis de diferenciación (Excoffier et al. 1992). La significación de los componentes de la varianza se obtiene a partir de tests de permutación no paramétricos. El método es muy generalista en el sentido que se puede aplicar a datos de marcadores moleculares de distinto tipo, se aplica directamente a frecuencias alélicas, el contenido genético de los haplotipos, y las secuencias de ADN, es un método muy utilizado en la literatura científica donde se han jerarquizado grupos o clusters bajo criterios lingüísticos, históricos o geográficos.

Por otro lado el estadístico $\hat{\theta}$ de Weir (Weir 1990) tiene una aplicación parecida a la AMOVA y analiza la heterogeneidad genética dentro y entre las agrupaciones realizadas por el investigador

$$\hat{\theta} = T_1 / T_2$$

con

$$T_1 = S_A^2 - \frac{1}{\bar{n} - 1} \left[\hat{p}_A (1 - \hat{p}_A) - \frac{r-1}{r} S_A^2 \right]$$

$$T_2 = \frac{n_c - 1}{\bar{n} - 1} \hat{p}_A (1 - \hat{p}_A) + \left[1 + \frac{(r-1)(\bar{n} - nc)}{\bar{n} - 1} \right] \frac{S_A^2}{r}$$

donde

$$S_A^2 = \frac{1}{(r-1)\bar{n}} \sum_i n_i (\hat{p}_{Ai} - \hat{p}_A)^2$$

para r poblaciones

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^r n_i}{r}$$

$$nc = \frac{1}{r-1} \left(\sum_{i=1}^r n_i - \frac{\sum_{i=1}^r n_i^2}{\sum_{i=1}^r n_i} \right)$$

$$\hat{p}_{A.} = \frac{\sum_{i=1}^r n_i \hat{p}_{Ai}}{\sum_{i=1}^r n_i}$$

$$\hat{p}_{Ai} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}$$

En una muestra de n_i genes de la población i^n , y para un gen j en una población i la variable $x_{ij}=1$ si el gen es el alelo a y $x_{ij}=0$ si el gen no es el alelo a . En el caso del estudio de haplogrupos del ADN mitocondrial, cada haplogrupo se trató como un alelo de manera que p_{Ai} es la frecuencia del haplogrupo A en las poblaciones i , p_{Bi} es la frecuencia del haplogrupo B en las poblaciones i y así sucesivamente.

La $\hat{\theta}$ global se calcula sumando la $\hat{\theta}$ estimada para cada uno de los distintos haplogrupos:

$$\hat{\theta}_{global} = \frac{\sum_{u=1}^4 T_u}{4} \text{ para el alelo } u^n$$

1.15.2 Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales es un método estadístico aplicable a datos genéticos que como otros métodos parecidos (biplot, análisis de coordenadas principales o el análisis multidimensional), consiste en simplificar la complejidad de los datos multivariantes reduciendo el número de dimensiones del espacio en el que se trabaja pero con la mínima pérdida de información. Al disminuir la complejidad inherente a los datos, el método permite identificar patrones de variación en éstos que posteriormente podrán ser interpretados bajo criterios de la genética de poblaciones. El citado método se ha aplicado con las frecuencias

relativas del ADN mitocondrial encontradas en la literatura o derivadas del propio estudio en las poblaciones del Beni. Los componentes principales no están correlacionados y por lo tanto pueden analizarse por separado. La cantidad de variabilidad explicada por cada componente principal disminuye a medida que se avanza con los diferentes componentes, siendo el que acumula la máxima variación el primero componente, seguidamente el segundo componente y así sucesivamente. Normalmente se trabaja con el primero y segundo componente. Los valores de componentes principales pueden representarse en mapas sintéticos donde los principales patrones están resumidos, dando una idea relativa de que haplogrupos provocan las principales diferencias entre poblaciones.

1.15.3 *Networks* filogenéticos

La construcción de *networks* filogenéticos se hace a partir de la variación en la secuencia de control del ADNmt y de los datos de los polimorfismos de restricción de longitud de fragmentos (RFLPs) mediante el “*reduced-median algorithm*” (Bandelt et al. 1995). El programa que desarrolla dicho algoritmo es el Network versión 4.1.1.2, dicho programa representa la variabilidad genética de un haplogrupo presente en una o en diversas poblaciones en una red o diagrama filogenético formado por círculos o nudos conectados por líneas. Las líneas están asociadas con las posiciones nucleotídicas donde se ha producido un cambio. La longitud de las líneas es proporcional al número de cambios producidos (Forster et al. 1996, Hernstadt et al. 2002) Los círculos están asociados con un haplotipo concreto y por lo tanto a un individuo o individuos. A partir de los *networks* filogenéticos se pueden inferir la edad de un haplogrupo representado (Saillard et al. 2000). El método de datación se basa en considerar el número de mutaciones acumuladas desde la secuencia ancestral como una función lineal de la tasa de mutación y del tiempo transcurrido.

1.15.4 Algoritmo UPGMA

A partir de las matrices de distancias genéticas se han obtenido los dendogramas utilizando el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair-group method using arithmetic averages*) que es una técnica de agrupación aglomerativa (Sneath and Sokal, 1973). Consiste en agrupar dos poblaciones (OTUs que son unidades taxonómicas operativas) cuyas distancias genéticas son las menores. La nueva distancia entre este par y el resto no agrupado será, la media aritmética de las dos que han sido agrupadas antes de la formación del clúster, respecto del resto. Este proceso se repite el número de veces necesario hasta que todas las poblaciones se agrupen.

La bondad de ajuste entre la matriz de distancias genéticas y la representación gráfica se mide por los estadísticos:

1. f (Farris, 1972),
$$f = \sum |D_{ij} - D'_{ij}|$$

f es el sumatorio de las diferencias entre las distancias de entrada y de salida, en valor absoluto, siendo D , la distancia de entrada de los OTUs i y j , y D' , la distancia de salida de los mismos.

2. F (Prager and Wilson, 1976) que expresa en porcentaje las diferencias de los valores de entrada y salida en función del total de los valores de entrada.

$$F = \frac{f}{\sum D_{ij}} 100$$

1.15.5 Índices de diversidad

Todos los índices se computaron con el programa Arlequin Ver. 2.000 (Schneider et al. 2000) con la opción Standard diversity indices dentro del apartado Diversity indices.

1.15.5.1 Número y porcentaje de sitios polimórficos

El número de sitios variables o polimórficos (v) se define como el número de loci útiles que presentan más de un alelo por locus (Schneider et al. 2000). En el caso de secuencias refleja el número de posiciones que varían entre el conjunto de secuencias alineadas. Este índice es claramente dependiente del tamaño de la secuencia estudiada, lo que puede corregirse dividiendo el número de posiciones variables entre el número de nucleótidos de la secuencia (porcentaje de sitios polimórficos).

1.15.5.2 Diversidad haplotípica

Cada variante mitocondrial definida respecto a la secuencia consenso (Anderson et al. 1981) constituye un haplotipo mitocondrial (k). El porcentaje de haplotipos diferentes (% k) se estimó en relación con número de individuos de cada población.

La diversidad genética de Nei (Nei, 1987) se define como la probabilidad de que dos alelos de una muestra escogidos al azar sean diferentes. Cuando se trabaja con secuencias, cada variante (haplotipo) equivale a un alelo, por lo que puede utilizarse este índice para evaluar la diversidad haplotípica del conjunto. Este estimador y su varianza asociada se calculan de la siguiente forma:

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

$$V(H) = \frac{2}{n(n-1)} \left\langle 2(n-2) \left[\sum_{i=1}^k p_i^3 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k p_i \right) \right\rangle$$

dónde n es el número de copias del gen, k es el número de alelos (haplotipos) y p_i es la frecuencia en la muestra del alelo (o haplotipo) i .

1.15.5.3 Número medio de diferencias por parejas y diversidad nucleotídica

El número medio de diferencias por parejas de secuencias se calcula:

$$\pi = \sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j d_{ij}$$

dónde p_i y p_j son las frecuencias en la muestra de los haplotipos i y j respectivamente y d_{ij} un estimador del número de mutaciones acontecidas desde la divergencia de dichos haplotipos.

La varianza total asociada a este índice, asumiendo neutralidad y ausencia de recombinación, es:

$$V(\pi) = \frac{3n(n+1)\pi + 2(n^2 + n + 3)\pi^2}{11(n^2 - 7n + 6)}$$

La diversidad nucleotídica es análoga a la diversidad genética de Nei pero al nivel de nucleótido. Este índice describe la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos escogidos al azar de entre un conjunto de secuencias sean diferentes. La diversidad nucleotídica puede calcularse como el número medio de diferencias entre parejas de secuencias (π) dividido por la longitud en pares de bases de la secuencia estudiada (Tajima 1993; Nei 1987). Las fórmulas correspondientes para este estimador y su varianza asociada, asumiendo neutralidad y ausencia de recombinación, son por lo tanto:

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

$$V(\pi_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \pi_n + \frac{2(n^2 + n + 3)}{9n(n-1)} \pi_n^2$$

dónde p_i y p_j son las frecuencias en la muestra de los haplotipos i y j , d_{ij} un estimador del número de mutaciones acontecidas desde la divergencia de dichos haplotipos y L la longitud de la secuencia analizada.

1.15.6 Distribución de las diferencias por parejas, *Mismatch distribution*

La representación de la distribución de las diferencias por parejas en un histograma además de resumir la diversidad genética de una población puede reflejar su historia demográfica. Según Rogers y Harpending (1992) los episodios de crecimiento o declive de una población dejan huellas discernibles en la distribución de las diferencias de nucleótidos entre pares de individuos.

La distribución de las diferencias por parejas de los diferentes fragmentos de ADNmt en los diferentes subconjuntos de población se calculó con el programa Arlequín 2000 (Schneider et al. 2000)

1.15.7 Análisis filogenético interpoblacional

1.15.7.1 Distancias genéticas

A partir de la frecuencia de los haplotipos presentes en las poblaciones y en los diferentes subconjuntos de población generados se calculó la distancia genética con los métodos de Reynolds entre pares de poblaciones (Reynolds et al. 1983), con el índice de Nei (Nei 1972) o con la *chord distance* de Cavalli-Sforza y Edwards (1967). El método de Reynolds asume que no existe mutación y que la deriva genética es el único factor responsable del cambio en las frecuencias de los haplotipos. La distancia genética de Nei (Nei 1972) no asume un tamaño efectivo de población constante e igual para todas las poblaciones. La *chord distance* de Cavalli-Sforza y Edwards es un método concordante con la historia demográfica de Sudamérica y no requiere de tamaños poblacionales constantes a lo largo del tiempo

El cálculo de la matriz de distancias entre los pares de poblaciones se realizó con el programa GENDIST del paquete PHYLIP 3.5c (Felsenstein 1993). La matriz de frecuencias de haplotipos fue calculada con el programa ARLEQUIN a partir de las secuencias en bruto, con el programa CLUSTAL V (Higgins et al. 1992) que previamente las alineo correctamente

1.15.7.2 Reconstrucción filogenética a partir de distancias genéticas

A partir de la matriz de distancias generada con el programa GENDIST del paquete PHYLIP se construyeron dos árboles sin raíz utilizando los métodos de reconstrucción filogenética de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei 1987) y un árbol con raíz utilizando el método de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) (Sneath y Sokal 1973).

El método de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei 1987) se basa en el agrupamiento sucesivo (*clustering*) de las diferentes líneas para la construcción del árbol, asignando la longitud de las ramas a medida que éstas se van uniendo. Este método de reconstrucción no asume reloj molecular, por lo que los árboles generados con él no presentan raíz. Para la construcción de un árbol de este tipo a partir de la matriz de distancias entre las diferentes poblaciones se empleó el programa NEIGHBOR del paquete PHYLIP 3.5c (Felsenstein 1993).

En la reconstrucción de UPGMA (Sneath y Sokal 1973) se produce una agrupación iterativa de aquellas líneas que presentan una menor distancia entre sí. Este método asume la existencia de reloj molecular y produce un árbol aditivo conocido como árbol ultramétrico, en el que la distancia entre cada taxón y la raíz es la misma. Este método asume una misma tasa de evolución para todos los taxones.

Una vez generados los árboles se visualizaron y editaron con el programa TREEVIEW (Win32) 1.6.6 (Page 2001).

1.15.8 Equilibrio Hardy-Weinberg

Se ha verificado el equilibrio Hardy-Weinberg, se considera que en una población, las frecuencias genotípicas están en equilibrio Hardy-Weinberg si se relacionan con las frecuencias génicas según una simple relación cuadrática de un binomio (loci dialélicos) o de un polinomio (tres o más alelos). Por la prueba estadística χ^2 es posible valorar si las diferencias entre las clases genotípicas observadas y esperadas, éstas últimas calculadas a partir de las frecuencias génicas observadas por una simple relación cuadrática, son debidas, con un cierto grado de verosimilitud, al efecto de la azar (Rohlf y Sokal 1969: Sokal y Rohlf, 1979)

La χ^2 , sigue una distribución continua, en la cual las variables toman sólo valores positivos, se trata de un grupo de distribuciones en función de los grados de libertad, que en este caso se calculan restando al número de clases fenotípicas, relativas al marcador considerado, el número de alelos para ese locus. Normalmente se establece un valor del 5% como límite para considerar la significación de las diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas de las esperadas, de manera que por encima de este valor se estima una actuación importante del azar, mientras que, por debajo del 5%, las diferencias serán significativas por la posible actuación de otros factores tales como la deriva genética, migración o selección natural.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

Las poblaciones del Piedemonte andino boliviano son potencialmente muy interesantes en el contexto de la biología y la evolución humana dada su ubicación geográfica a medio camino de la zona andina y la amazónica y por el contexto de su historia.

El Piedemonte es una ruta natural de paso entre las dos áreas que presenta una historia demográfica compleja con llegadas migratorias primitivas, influencias incaicas y reducciones franciscanas y jesuíticas que influyeron en la dinámica poblacional de los grupos que allí habitaban y que, en la actualidad, si bien mantienen sus peculiaridades culturales y lingüísticas, poseen un reducido efectivo poblacional.

El análisis genético de las poblaciones humanas ha demostrado ser uno de los enfoques más útiles para investigar la estructura, el origen y la dinámica de las poblaciones.

Aunque los estudios genéticos no substituyen la necesidad de efectuar investigaciones histórico-arqueológicas y biodemográficas, los datos genéticos de las poblaciones actuales dan información sobre aquellas características que estarían en la población original y que siguen estando representadas en la población actual. Así pues, el análisis genético de las poblaciones del Piedemonte boliviano se puede utilizar para inferir sobre el origen, composición y influencia genética de los primeros grupos humanos que llegaron a la zona.

Por otro lado, los movimientos migratorios más recientes de otras poblaciones hacen de la región del Piedemonte una zona excelente para estudiar la diversidad y microdiferenciación de las poblaciones humanas en el continente americano.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo central describir genéticamente las poblaciones Aymará, Quechua, Chimane y Mositén asentadas en el Oriente Boliviano, el estudio genético se basa en el análisis de los haplogrupos del ADN mitocondrial, el estudio de la secuencia nucleotídica de la región hipervariable I del ADN mitocondrial, los STRs del cromosoma Y así como el análisis de polimorfismos VNTRs. El estudio también pretende comparar dichas poblaciones con otras del contexto sudamericano tanto las asentadas en la zona andina como la amazónica. La región es un territorio multiétnico con poblaciones pertenecientes a los cuatro troncos lingüísticos de Sudamérica.

Los objetivos generales de la tesis se detallan a continuación:

1. Presentar una perspectiva de la estructura biodemográfica del Piedemonte, teniendo en cuenta el censo indígena elaborado por el Centro de Estudios Demográficos del gobierno de Bolivia.
2. Caracterizar genéticamente las poblaciones Aymará, Quechua, Chimane y Mosetén utilizando los cuatro haplogrupos característicos del ADN mitocondrial, la secuencia nucleotídica de la región hipervariable I del ADN mitocondrial, el análisis de polimorfismos VNTRs del ADN nuclear y los STRs del cromosoma Y.
3. Conocer el grado de heterogeneidad genética entre las poblaciones de origen altiplánico (Aymará y Quechua) de las de Piedemonte (Chimane y Mosetén)
4. Determinar la posible influencia de las poblaciones altiplánicas en la genética de las poblaciones del Piedemonte.
5. Completar una visión integradora de los distintos modelos del poblamiento de la región.
6. Determinar si las diferencias genéticas entre las poblaciones del Piedemonte son debidas a barreras geográficas, factores históricos o lingüísticos.
7. Ubicar en el contexto sudamericano las poblaciones estudiadas comparándolas con otras poblaciones andinas y amazónicas.

Éstos objetivos se han conseguido con mayor o menor éxito y se han presentado a la comunidad científica mediante la participación en dos congresos científicos, uno nacional y otro internacional, y la publicación de nueve artículos en revistas internacionales, uno de los cuales está en preparación.

La participación en los congresos se concreta en:

1. La presentación de un póster y una ponencia en el XI Congreso de la Sociedad Española de Antropología Biológica realizado Santiago de Compostela ESPANYA (1998) código: 160062 Autores: Corella, A.; Bert, F.; Pérez-Pérez, A.; Turbón, D. Con el título: Diversidad genética de las poblaciones indígenas del Oriente boliviano inferida del análisis de haplogrupos mitocondriales.

2. La presentación de un póster y una ponencia en el *22nd Congress of the International Society for Forensic Genetics, 21–25 August 2007* - Copenhagen – Denmark. Con el título P-161 Genetic structure of the population of Beni Department (North Bolivia). A.M. López-Parra, Universidad Complutense de Madrid, Spain, M. Tirado, Universidad Complutense de Madrid, Spain, C. Baeza, Universidad Complutense de Madrid, Spain, F. Bert, Universidad de Barcelona, Spain, A. Corella, Universidad de Barcelona, Spain, PhD. A. Pérez-Pérez, Universidad de Barcelona, Spain, C. Gamba, Universidad Complutense de Madrid, Spain, PhD. E. Fernández, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

Las publicaciones están centradas en el análisis de distintos marcadores genéticos y su comparación con otras poblaciones.

2.2 Objetivos específicos

Publicación 1: Gene, M., M. Fuentes, E. Huguet, E. Pique, F. Bert, A. Corella, A. Pérez-Pérez, J. Corbella & P. Moreno. 1998. Quechua Amerindian population characterized by HLA-DQA1, YNZ22, 3'APO B, HUMTH01 and HUMVWA31A polymorphisms. *J. Forensic Sci.* **43**(2):403-405

1. Caracterizar una muestra de población Quechua de la región de Oruro para los marcadores genéticos STRs, HLA-DQ α , YNZ22, 3'APOB, HUMTH01 y HUMVWA31A.
2. Determinar la posible divergencia del equilibrio Hardy-Weinberg para cada marcador.
3. Calcular el desequilibrio de ligamiento para los distintos marcadores.
4. Calcular los valores de poder de discriminación y oportunidad de exclusión.

Publicación 2: Gene, M., P. Moreno, N. Borrego, E. Pique, A. Xifro, M. Fuentes, F. Bert, A. Corella, A. Pérez-Pérez, D. Turbón, J. Corbella & E. Huguet. 2000. Population study of Aymara Amerindians for the PCR-DNA polymorphisms HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQA1. *Int. J. Legal Med.* **113**: 126-128. *Sci.* 43(2): 403-405

1. Caracterizar una muestra de población Aymara de la región de Pacajes y Murillo para los marcadores genéticos STRs, HLA-DQ α , YNZ22, HUMTH01 HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253.
2. Determinar la posible divergencia del equilibrio Hardy-Weinberg para cada marcador.
3. Calcular el desequilibrio de ligamiento para los distintos marcadores.
4. Calcular los valores de poder de discriminación y oportunidad de exclusión.

Publicación 3: Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A and Turbón D, (2001) Major Mitochondrial DNA Haplotype Heterogeneity in Highland and Lowland Amerindian Populations from Bolivia. *Hum. Biol.* **73**:1-16

1. Proponer una metodología de análisis jerárquico que permita la determinación de haplogrupos del ADNmt en poblaciones amerindias.
2. Caracterizar las poblaciones Chimane, Mosestén, Aymará, Quechua, Yuracaré, Movima, Ignaciana y Trinitaria para los haplogrupos principales de ADN mitocondrial.
3. Describir las condiciones de análisis (primers, condiciones de PCR y de digestión) para cada una de las posiciones seleccionadas para la determinación de haplogrupos mitocondriales.
4. Determinar la diversidad genética de los grupos estudiados utilizando los indicadores h de Nei (1987), θ Weir (1990) y el análisis de la varianza molecular o AMOVA (Excoffier et al. 1992).
5. Comparar los resultados de diversidad genética entre las distintas poblaciones utilizando diferentes distancias genéticas para generar árboles filogenéticos UPGMA.

Publicación 4: Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A y D Turbón, (2004)
Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracaré
Amerindian populations from Bolivia lowlands *Ann. Hum. Biol.* **31** (1): 9-28

1. Describir la variación del ADNmt en la poblaciones estudiadas.
2. Contribuir a la caracterización de la estructura genética de cada población, concretamente:
 - a. Verificar si existen diferencias en la composición del DNAm de las tres poblaciones estudiadas.
 - b. Evaluar y comparar los niveles de diversidad observados intra e interpoblacionales utilizando otras poblaciones del contexto sudamericano.
3. Determinar la diversidad genética de los grupos estudiados utilizando los indicadores h de Nei (1987) y el análisis de la varianza molecular o AMOVA (Excoffier et al. 1992)
4. Utilizar el análisis filogenético para relacionar entre sí las diferentes poblaciones.

Publicación 5: Corella A., Bert F., Pérez-Pérez A., Gené M. y Turbón D., (2007)
Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian Populations living in the Andean Piedmont
of Bolivia: Chimane, Mosestén, Aymara and Quechua. *Ann. Hum. Biol.* **34**(1): 34-55

1. Describir la variación del ADNmt en la poblaciones estudiadas.
2. Contribuir a la caracterización de la estructura genética de cada población, concretamente:
 - a. Verificar si existen diferencias en la composición del DNAm de las tres poblaciones estudiadas.
 - b. Evaluar y comparar los niveles de diversidad observados intra e interpoblacionales utilizando otras poblaciones del contexto sudamericano.
3. Determinar la diversidad genética de los grupos estudiados utilizando los indicadores h de Nei (1987) y el análisis de la varianza molecular o AMOVA (Excoffier et al. 1992).
4. Situar y relacionar mediante el análisis filogenético las diferentes poblaciones en el contexto de las poblaciones sudamericanas.

Publicación 6: Corella A., Bert F., Pérez-Pérez A., Gené M. y Turbón D.

HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms in Amerindian populations living in the Beni Department of Bolivia, (2008), *Ann. Hum. Biol.* **35** (5): 556- 564

1. Caracterizar una muestra de población Quechua, Aymará y Beniana de la región de Moxos para los marcadores genéticos STRs, HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO y HUMTPOX.
2. Determinar la posible divergencia del equilibrio Hardy-Weinberg para cada marcador y para población.
3. Calcular el desequilibrio de ligamiento para los distintos marcadores en las diferentes poblaciones.
4. Calcular los valores de poder de discriminación y oportunidad de exclusión.
5. Determinar la similitud genética entre las distintas poblaciones sudamericanas incluidas las del presente trabajo mediante la técnica de Análisis de componentes principales.

Publicación 7: López-Parra AM, Tirado M, Baeza C, Bert, F, Corella A, Pérez-Pérez A, Gamba C, Fernández E, Arroyo-Pardo E. Genetic structure of the population of Beni department (North Bolivia), (2008), *For. Sci. Int.* **1**: 348-349

1. Analizar marcadores Y-STR en una muestra de poblaciones del departamento del Beni (Bolivia).
2. Determinar el grado de diferenciación genética de las poblaciones estudiadas comparándolas con otras del continente sudamericano mediante *Multidimensional Scalling* (MDS) a partir de la matriz de distancias Rst.
3. Valorar el grado de mestizaje de las poblaciones benianas.
4. Comparar los resultados de diversidad genética entre las distintas poblaciones utilizando diferentes distancias genéticas para generar árboles filogenéticos *Neighbor joining*.

Publicación 8: Tirado M., López-Parra A.M., Baeza C., Bert F., Corella A., Pérez-Pérez A., Turbón D. y Arroyo-Pardo E. Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs included in AmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit in a multi ethnic population from El Beni Department (North Bolivia) (2009) *Leg. Med.* **11**(2): 101-103

1. Analizar 17 marcadores Y-STR en una población multiétnica del departamento del Beni (Bolivia).
2. Determinar el grado de diferenciación genética de las poblaciones estudiadas comparándolas con otras del continente sudamericano mediante *Multidimensional Scalling* (MDS) a partir de la matriz de distancias Rst.

Publicación 9: Bert F, Corella A, Pérez-Pérez A, Gené M, and Turbón D. Piedmont and Llanos de Moxos living in the Beni Department (Bolivia) characterized by HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms. (en preparación)

1. Caracterizar una muestra de población Aymará; Chimane; Ignaciano; Mositén; Movima; Quechua; Trinitario; Yuracaré del departamento del Beni para los marcadores genéticos STRs, HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO y HUMTPOX.
2. Determinar la posible divergencia del equilibrio Hardy-Weinberg para cada marcador y para población.
3. Calcular el desequilibrio de ligamiento para los distintos marcadores en las diferentes poblaciones.
4. Calcular los valores de poder de discriminación y oportunidad de exclusión.
5. Determinar la similitud genética entre las distintas poblaciones sudamericanas incluidas las del presente trabajo mediante la técnica de Análisis de componentes principales, técnicas Kriging de interpolación lineal y árboles filogenéticos UPGMA.

3. PUBLICACIONES

3. PUBLICACIONES

3.1 Informe de los Directores de tesis

La tesis doctoral “*Aspectos biodemográficos de grupos étnicos Macro-Pano de Bolivia y caracterización genética de las poblaciones Aymará, Quechua Chimane y Mositén*” está elaborada y articulada sobre la base de los resultados originales obtenidos en ocho artículos publicados y uno en preparación para su publicación por Francesc Bert Fibla. Los artículos realizados han sido publicados en revistas internacionales diferentes, todas ellas basadas en el sistema de revisión *peer review*.

Los objetivos de las investigaciones realizadas en los nueve artículos son la descripción genética y el análisis de la variación poblacional de cuatro poblaciones; Aymará, Quechua, Chimane y Mositén del Piedemonte andino de Bolivia, mediante el análisis del ADN mitocondrial, del cromosoma Y y de marcadores STR autosómicos con la intención de aportar información acerca del poblamiento humano de la zona de contacto andino-amazónica.

La gran cantidad de datos genéticos poblacionales obtenidos sobre los distintos marcadores genéticos así como los referentes a las poblaciones estudiadas han supuesto un avance importante en el conocimiento de la variación genética de las poblaciones actuales de ésta una subregión de Sudamérica hasta el momento desconocida.

La relevancia de la investigación realizada en los campos de la antropología biológica y de la genética de las poblaciones humanas queda demostrada por la calidad de las revistas donde han sido publicados los resultados obtenidos.

Respecto a la publicación 1: Gené, M., M. Fuentes, E. Huguet, E. Piqué, F. Bert, A. Corella, A. Pérez-Pérez, J. Corbella & P. Moreno. 1998. Quechua Amerindian population characterized by HLA-DQA1, YNZ22, 3'APO B, HUMTH01 and HUMVWA31A polymorphisms. *J Forensic Sci* **43** (2): 403-405. Francesc Bert, llevo a termino la recogida de parte de las muestras y participó activamente en la redacción de la introducción del artículo. La revista *Journal of Forensic Sciences* tiene un factor de impacto IF = 0,769, MEDICINE, LEGAL, 6 de 9 (Tercer Cuartil).

En la publicación 2: Gené, M., P. Moreno, N. Borrego, E. Piqué, A. Xifro, M. Fuentes, F. Bert, A. Corella, A. Pérez-Pérez, D. Turbón, J. Corbella & E. Huguet. 2000. Population study of Aymara Amerindians for the PCR-DNA polymorphisms HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQA1. *Int J Legal Med* **113**: 126-128. Francesc Bert participó en la recogida de muestras y en el análisis estadístico de los resultados. La revista *International Journal of Legal Medicine* tiene un IF = 1,497, MEDICINE, LEGAL, 1 de 9 (Primer Cuartil); PATHOLOGY, 25 de 67 (Segundo Cuartil).

En referencia a la publicación 3: Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A and Turbón D. 2001. Major Mitochondrial DNA Haplotype Heterogeneity in Highland and Lowland Amerindian Populations from Bolivia. *Hum Biol*, **73**: 1-16. Francesc Bert, participó en la recogida de muestras, en los procesos de extracción del ADN mitocondrial y determinación de los haplogrupos mediante la técnica de la PCR. Francesc Bert, realizó el análisis estadístico y participó activamente en la discusión de los resultados y elaboración del manuscrito. La revista *Human Biology* tiene un IF = 1,664, BIOLOGY, 13 de 42 (Tercer Cuartil); GENETICS & HEREDITY, 71 de 113 (Segundo Cuartil).

En la publicación 4: Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A y D Turbón. 2004. Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracaré Amerindian populations from Bolivia lowlands. *Ann Hum Biol* **31** (1): 9-28. Francesc Bert intervino activamente en la recogida de muestras, en la secuenciación de las muestras así como en el manuscrito de la introducción y las conclusiones. La revista *Annals of Human Biology* tiene un IF = 0,991, BIOLOGY, 37 de 64 (Segundo Cuartil); PUBLIC, ENVIRONMENTAL & OCCUPATIONAL HEALTH, 63 de 93 (Segundo Cuartil)

Respecto a la publicación 5: Corella A, Bert F, Pérez-Pérez A., Gené M y Turbón D. 2007. Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian Populations living in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Mosestén, Aymara and Quechua. *Ann Hum Biol* **34** (1): 34-55. Francesc Bert, participó en la recogida de muestras, en la extracción del ADN mitocondrial y realizó el análisis estadístico de los resultados. Francesc Bert, También participó activamente en la elaboración de las conclusiones del artículo y en la elaboración del manuscrito en general. La revista *Annals of Human Biology* tiene un IF = 1,060, BIOLOGY, 43 de 70 (Segundo Cuartil); PUBLIC, ENVIRONMENTAL & OCCUPATIONAL HEALTH, 77 de 100 (Primer Cuartil).

En la publicación 6: Corella A, Bert F, Pérez-Pérez A, Gené M y Turbón D. 2008. HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms in Amerindian populations living in the Beni Department of Bolivia. *Ann Hum Biol* **35** (5): 556-564. Francesc Bert intervino en la recogida de muestras, en el proceso de extracción del ADN así como en el manuscrito del artículo. La revista *Annals of Human Biology* tiene un IF = 1,060, BIOLOGY, 43 de 70 (Segundo Cuartil); PUBLIC, ENVIRONMENTAL & OCCUPATIONAL HEALTH, 77 de 100 (Primer Cuartil).

En la publicación 7: López-Parra AM, Tirado M, Baeza C, Bert, F, Corella A, Pérez-Pérez A, Gamba C, Fernández E, Arroyo-Pardo E. 2008. Genetic structure of the population of Beni department (North Bolivia). *For Sci Int* 1: 348-349. Francesc Bert colaboró en la recogida de muestras y en el apartado introductorio del artículo. La revista *Forensic Science International* tiene un IF = 1,928, MEDICINE, LEGAL. 3 de 11 (Cuartil 2).

En referencia a la publicación 8: Tirado M, López-Parra AM, Baeza C, Bert F, Corella A, Pérez-Pérez A, Turbón D y Arroyo-Pardo E. 2009. Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs included in AmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit in a multi ethnical population from El Beni Department (North Bolivia). *Legal Med* 11 (2): 101-103. Francesc Bert participó en la obtención de muestras y en la extracción del ADN. La revista *Legal Medicine* no está referenciada en el SCI pero es una revista internacional de prestigio considerable.

En la publicación 9 (en preparación): Bert F, Corella A, Pérez-Pérez A, Gené M, and Turbón D. Aymara, Chimane, Ignaciano, Mosestén, Movima, Quechua, Trinitario and Yuracaré, populations living in the Beni Department (Bolivia) characterized by HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms. Francesc Bert ha participado en la recogida de muestras, en el redactado de los apartados de métodos y conclusiones así como en el análisis estadístico.

Barcelona, 4 de Febrero de 2011

Dr. Daniel Turbón Borrega

Dr. Alejandro Martínez Pérez-Pérez

3.2

Authorized Reprint from Journal of Forensic Sciences, March 1998 ©Copyright 1998
American Society for Testing and Materials, 100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA 19428-2959

TECHNICAL NOTE

Manel Gené,¹ M.D., Ph.D.; Miriam Fuentes,² M.D., Ph.D.; Emili Huguet,¹ M.D., Ph.D.; Esther Piqué,¹ B.S.; Francesc Bert,³ B.S.; Alfons Corella,³ B.S.; Alejandro Pérez-Pérez,³ Ph.D.; Jacint Corbella,¹ M.D., Ph.D., and Pasqual Moreno,³ Ph.D.

Quechua Amerindian Population Characterized by HLA-DQ α , YNZ22, 3'APO B, HUMTH01, and HUMVWA31A polymorphisms

En el artículo se analizan las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos genéticos HLA-DQ α , YNZ22, 3'APO B, HUMTH01 y HUMVWA31A de una muestra de 113 individuos Quechuas originarios de Bolivia. El registro y los datos de estos marcadores genéticos en poblaciones autóctonas de Sudamérica era escaso cuando se realizó el artículo.

La población Quechua, definida por ser los antepasados de la cultura Inca y por compartir una lengua propia, ampliamente distribuida en el área andina del continente Americano es uno de los grupos humanos numéricamente más importantes de Sudamérica, su población estimada oscila entre los 5 y los 7 millones de habitantes. Los Quechuas estudiados en el artículo habitan en la Provincia de Dalence del Departamento de Oruro (Bolivia).

Las muestras analizadas consistieron en dos bulbos pilosos para cada uno de los 113 individuos de ambos sexos que previamente y mediante una encuesta se aseguró que no estaban emparentados. El ADN se extrajo utilizando CheelexTM 100 utilizando el método descrito por Walsh et al. (1991)

La amplificación mediante la técnica de la PCR de los alelos HLA-DQ α se realizó con el Kit AmpliTypeTM de Perkin-Elmer. Para los polimorfismos de los minisatélites YNZ22 y 3'ApoB se han seguido los protocolos descritos por Boerwinkle et al. (1989), Batanian et al. (1990) y Walsh et al. (1991). La detección de los diferentes alelos se realizó a partir de una electroforesis con bromuro de etidio en un gel de agarosa 2% Seakem GTG-FMCTM para los polimorfismos de YNZ22 y 3% NuSieve 3:1 FMCTM para 3'ApoB.

HUMTH01 y HUMVWA31A son microsátélites VNTRs. La amplificación por PCR se realizó utilizando los primers o cebadores descritos por Edwards et al. (1992) y Kimpton

et al. (1992) respectivamente. En los primers se utilizaron marcadores fluorescentes, las condiciones de la PCR fueron las mismas descritas por Wiegand et al. (1993) y Möller et al. (1994) respectivamente. La separación de los alelos se hizo en gel de acrilamida/bisacrilamida utilizando el láser fluorescente automático (ALF) *DNA sequencer* (Pharmacia).

Todas las amplificaciones de ADN realizadas utilizaron muestras de control tanto positivas como negativas.

La frecuencia para cada alelo varia según el polimorfismo estudiado. Los tamaños muestrales fueron HLA-DQ α , HUMTH01, HUMVWA31A, n=108 YNZ22 n=103 y 3'APO B n=107. Debido a que para algunos individuos no se pudieron determinar los polimorfismos se analizó la posible desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) con el test propuesto por Guo y Thompson (1992). El desequilibrio de ligamiento fue calculado utilizando el programa GENEPOP. También se calcularon el poder de discriminación (PD) y la probabilidad de exclusión (CE)

La totalidad de las distribuciones genotípicas de los cinco polimorfismos estudiados se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y el test de análisis de correlación interclases demostró que no hay correlación entre pares de alelos de cualquier de los cinco loci. Los resultados demuestran una clara distinción entre la población Quechua y las poblaciones caucasoides estudiadas previamente por algunos autores .

La población Quechua también difiere de las poblaciones Inuit y amerindias mejicanas para el marcador HUMTH01 y de las poblaciones Pehuenche y Dogrib para 3'Apo B. Los valores de los discriminantes genéticos PD y CE observados para los cinco sistemas son inferiores a los descritos para poblaciones europeas.

Los autores agradecen la colaboración de los habitantes Quechua de la provincia de Oruro.

TECHNICAL NOTE

Manel Gené,¹ M.D., Ph.D.; Miriam Fuentes,² M.D., Ph.D.; Emili Huguet,¹ M.D., Ph.D.; Esther Piqué,¹ B.S.; Francesc Bert,³ B.S.; Alfons Corella,³ B.S.; Alejandro Pérez-Pérez,³ Ph.D.; Jacint Corbella,¹ M.D., Ph.D., and Pasqual Moreno,³ Ph.D.

Quechua Amerindian Population Characterized by HLA-DQ α , YNZ22, 3'APO B, HUMTH01, and HUMVWA31A polymorphisms

REFERENCE: Gené M, Fuentes M, Huguet E, Piqué E, Bert F, Corella A, Pérez-Pérez A, Corbella J, Moreno P. Quechua amerindian population characterized by HLA-DQ α , YNZ22, 3'APO B, HUMTH01, and HUMVWA31A polymorphisms. *J Forensic Sci* 1998;43(2):403-405.

ABSTRACT: Allele and genotype frequencies of DNA polymorphisms were determined in a population sample of Quechua ($n = 113$) using the polymerase chain reaction (PCR). We report data on the frequencies of HLA-DQ α , YNZ22, 3'ApoB, HUMTH01 and HUMVWA31A alleles and the distribution of the different genotypes. No significant deviations between observed and expected numbers were found, thus assuming the Hardy-Weinberg equilibrium.

KEYWORDS: forensic genetics, HLA-DQ α , YNZ22 (D17S5), 3'ApoB, HUMTH01, HUMVWA31A, Quechua population

The amplification of DNA sequences by means of polymerase chain reaction (PCR) has provided a number of rapid approaches to determine DNA polymorphisms. Although many populations have been studied using DNA polymorphisms, to date there is a complete lack of tetrameric STRs data of autochthonous South American Indians. This paper presents data on the frequencies of HLA-DQ α , YNZ22, 3'ApoB, HUMTH01, and HUMVWA31A alleles and the distribution of the different genotypes in a sample of Quechua population.

The Quechua is the language spoken today by the descendants of the Incas, as well as by the tribes they conquered, in Peru, Ecuador, Colombia, and Bolivia. The center of Quechua is in the highlands of Peru, Bolivia, and Ecuador, but it has spread to the highland areas of southern Colombia, northern Chile and Argentina, the west coast of Peru, and the lowlands of Peru and Bolivia on the east slope of the Andes Mountains. At present the Quechua

population is represented by 5 to 7 millions inhabitants (1). The Quechuas studied belong to the province of Dalence, Department of Oruro (Bolivia).

Materials and Methods

Preparation of DNA

The biological samples analyzed consist of two hair-pulls with bulb from 113 unrelated individuals (both sexes) from the Quechua ethnic. DNA was extracted with Chelex™ 100 using the method described by Walsh et al. (2).

PCR Amplification and Typing

The HLA-DQ α alleles were detected using the Perkin-Elmer AmpliType™ kit was used. This procedure detects the allelic sequence variation in the locus by hybridization of biotinylated primers PCR product with immobilized allele-specific oligonucleotide probes (ASO), using a "reverse dot-blot" procedure.

YNZ22 and 3'ApoB are Minisatellite VNTR polymorphisms. PCR amplification of 3'ApoB and YNZ22 were accomplished by the methods described by Boerwinkle et al. (3) and Batanian et al. (4), and Walsh et al. (5), respectively, with some modifications introduced by us and described previously for Catalonian (NE Spain) sample studies (6,7). Detection of the different alleles, from PCR-amplification products, were carried out by ethidium bromide 15 × 20 agarose gel electrophoresis (2% Seakem GTG-FMC™ agarose for YNZ22, and 3% NuSieve 3:1 FMC™ agarose for 3'ApoB), along with allelic ladders of a cocktail sample.

HUMTH01 and HUMVWA31A are tetrameric short tandem repeats (STRs), or Microsatellite VNTRs. PCR amplification was achieved using the primers described by Edwards et al. (8) and Kimpton et al. (9) respectively. Forward primers were labelled with fluorescein amidite in 5' position. The reaction assay and the amplification conditions were carried out as described by Wiegand et al. (10) and Möller et al. (11) respectively. Separation of alleles was done on 6% (w/v acrylamide/bisacrilamide) polyacrylamide denaturing high-performance DNA sequencing gels (Ready Mix Gel ALF grade, Pharmacia) using Automated Laser Fluorescent (ALF) DNA sequencer (Pharmacia). Fluorescent labelled standard markers and a cocktail sample containing all observed alleles was used as an allelic ladder.

¹Associate professor, Professor, Adjunct assistant professor, and Professor. Department of Legal Medicine, Forensic Genetics Laboratory, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

²Adjunct assistant professor, Preventive Medicine Unit, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

³Anthropologists and Professor, Department of Animal Biology, Section of Anthropology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received 21 Feb. 1997; and in revised form 14 July 1997; accepted 16 July 1997.

TABLE 1—Genotype and allele frequencies distribution at the HLA-DQ α locus in a sample of 108 Quechua.

Allele	Frequency						
	1.1	1.2	1.3	2	3	4	
1.1	—	—	—	—	1	2	0.014
1.2	—	—	—	—	—	1	0.005
1.3	—	—	—	—	1	1	0.009
2	—	—	—	—	1	—	0.005
3	—	—	—	—	20	61	0.481
4	—	—	—	—	—	20	0.486

Exact Test: P = 0.2135.

Except HLA-DQ α , for the rest of loci we used a standard nomenclature for DNA fragments based on the number of repeats. All PCR amplifications were performed together with negative and positive control samples.

Statistical Analysis

The frequency of each allele for each polymorphism was calculated using the gene count method. Sample sizes vary in the different systems (HLA-DQ α , HUMTH01, HUMVWA31A, n = 108; YNZ22, n = 103; 3' APO B, n = 107) due to missing data for some individuals. Possible divergence from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was determined by calculating the exact test proposed by Guo and Thompson (12). The genotype linkage disequilibrium was calculated using the updated version of GENEPOP (13). From a forensic point of view, the power discrimination (PD) (14) and the "a priori" chance exclusion value (CE) (15) were calculated.

Results and Discussion

For the five systems the genotype and allele frequencies in the population analyzed are shown in Tables 1, 2, 3, 4 and 5. The HLA-DQ α analysis demonstrated 7 expected genotypes, representing products of 6 alleles. Alleles 3 and 4 present the highest frequencies with a 96.8% of total. YNZ22 polymorphism presents 8 genotypes representing products of 6 alleles, of which allele 4 presents the highest frequency (80%). At the locus 3' Apo B, 20 genotypes were observed corresponding to 8 alleles. The sum of frequencies of alleles 37, 39 and 49 represents the 75.4% of the total. The HUMTH01 system presents 6 genotypes, product of 3 alleles, with the highest frequencies in allele 7 (61%). For HUMVWA31A has

TABLE 2—Genotype and allele frequency distribution at the YNZ22 locus in a sample of 103 Quechua.

Allele	Frequency										
	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	0.009
3	—	2	10	—	—	—	—	—	1	—	0.073
4	—	—	69	7	3	6	—	—	2	1	0.820
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.034
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.015
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.029
8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.015
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.005

Exact test: P = 0.6550.

TABLE 3—Genotype and allele frequency distribution at the 3' ApoB locus in a sample of 107 Quechua.

Allele	Frequency										
	31	33	35	37	39	41	43	45	47	49	
31	—	—	2	1	—	—	—	1	1	—	0.023
33	—	—	—	2	—	—	—	—	3	—	0.023
35	—	—	12	15	5	1	—	3	5	2	0.266
37	—	—	—	14	5	—	—	2	14	3	0.327
39	—	—	—	—	2	1	—	—	3	1	0.089
41	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.009
43	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45	—	—	—	—	—	—	—	2	4	1	0.070
47	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	0.159
49	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.033

Exact test: P = 0.1507.

TABLE 4—Genotype and allele frequency distribution at the HUMTH01 locus in a sample of 108 Quechua.

Allele	Frequency					
	6	7	8	9	9.3	
6	4	28	—	—	4	0.185
7	—	37	2	1	23	0.593
8	—	—	—	—	—	0.009
9	—	—	—	—	2	0.014
9.3	—	—	—	—	7	0.199

Exact test: P = 0.2264.

TABLE 5—Genotype and allele frequency distribution at the HUMVWA31A locus in a sample of 108 Quechua.

Allele	Frequency							
	14	15	16	17	18	19	20	
14	—	2	1	—	—	—	—	0.014
15	—	5	16	5	2	—	—	0.153
16	—	—	10	20	6	3	2	0.319
17	—	—	—	17	10	4	—	0.343
18	—	—	—	—	3	2	—	0.120
19	—	—	—	—	—	—	—	0.042
20	—	—	—	—	—	—	—	0.009

Exact test: P = 0.1165.

been observed 12 genotypes corresponding to 5 alleles. The alleles 16, 17 and 18 represents the 90.9% of the total allelic frequency.

For all the polymorphisms analyzed the distribution of the genotypes are in Hardy-Weinberg equilibrium. An inter-class correlation test analysis demonstrated that there is no detectable evidence for correlation between the alleles at any of the pair-wise comparisons of the five loci. The allele frequencies obtained in the Quechua population for all the polymorphisms clearly differ from Caucasoid populations studied by us (6,7,16,17). Amerindian samples have been analyzed only for HUMTH01 and 3'Apo B systems. For HUMTH01, Quechua differ significantly from Eskimos and Mexican-Americans (18). They also differ for 3'Apo B from Pehuenche and Dogrib Indians (19). The PD and CE values observed for the five systems are shown in the Table 6. The observed allelic frequencies and the theoretical "a priori" forensic values (PD, CE) are lower than previously described for European populations (6,7,16), thus these systems seem less informative for Legal Medicine purposes in the Quechua population.

TABLE 6—Statistical parameters of medico-legal interest for the STR systems HLA-DQ α , YNZ22, 3'APO B, HUMTH01, and HUMVWA31A.

System	H	PD	CE
HLA-DQ α	62.96	0.671	0.229
YNZ22	31.07	0.526	0.184
3'APO B	70.09	0.894	0.585
HUMTH01	55.55	0.764	0.325
HUMVWA31A	67.59	0.890	0.511

H: Heterozygosity value.
 PD: Power of discrimination.
 CE: Chance of exclusion.

Acknowledgments

We are thankful to the Quechua population for its generous collaboration in the present study. This work has been partially funded by a Spanish M.E.C. grant (PB-93-0021).

References

1. Olson JS. The Indians of Central and South America: An Ethnohistorical Dictionary. Greenwood Press, New York, 1991.
2. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-base typing from forensic material. *Biotechniques* 1991;10:506-13.
3. Boerwinkle E, Xiong W, Pourest E, Chan L. Rapid typing of tandemly hypervariable loci by the polymerase chain reaction: Application of the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:212-6.
4. Batanian JR, Ledbetter SA, Wolff RK, Nakamura Y, White R, Dobyns WB, et al. Rapid diagnosis of Miller-Dieker syndrome and isolated lissencephaly sequence by the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990;85:555-9.
5. Walsh PS, Erlich HA, Higuchi R. Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR methods and applications* 1992;1:241-50.
6. Gené M, Huguet E, Sánchez-García C, Moreno P, Corbella J, Mezquita J. Suitability of the YNZ22 (D17S5) VNTR polymorphism for legal medicine investigations in the population of Catalonia (Spain). *Int J Legal Med* 1995a;107:222-4.

7. Gené M, Huguet E, Sánchez-García C, Moreno P, Corbella J, Mezquita J. Study of the 3'-ApoB minisatellite performed by PCR in the population of Catalonia (NE Spain). *Hum Hered* 1995b;45:70-4.
8. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, and Chakraborty R, et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992;12:241-53.
9. Kimpton C, Walton A, P Gill P. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the VWF gene. *Hum Mol Genetics* 1992;1:287.
10. Wiegand P, Budowle B, Rand S, Brinkmann B. Forensic validation of the STR systems SE33 and TC11. *Int J Legal Med* 1993;105:315-20.
11. Möller A, Wiegand P, Grüşchow C, Seuchter SA, Baur MP, Brinkmann B. Population data and forensic efficiency values for the STR systems HumVWA, HumMBP and HumFABP. *Int J Legal Med* 1994;106:183-9.
12. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple allele. *Biometrics* 1992;48:361-72.
13. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 1995;86:248-9.
14. Fisher R. Standard calculations for evaluating a blood group system. *Heredity* 1951;5:95-102.
15. Silver H. Probability of inclusion in paternity testing. American Association of Blood Banks, Arlington, 1982.
16. Gené M, Huguet E, Moreno P, Sánchez C, Carracedo A, Corbella J. Population study of the STRs HUMTH01 (including a new variant) and HUMVWA31A in Catalonia (northeast Spain). *Int J Legal Med* 1996;108:318-29.
17. Huguet E, Gené M, Corbella J, Moreno P. Distribution of the HLA-DQ α alleles and genotypes in a sample of a population from Barcelona (Spain). *Hum Herd* 1993;43:326-8.
18. Nellesmann LJ, Möller A, Morling N. PCR typing of DNA fragments of the short tandem repeat (STR) system HUMTH01 in Danes and Greenland Eskimos. *Forensic Sci Int* 1994;68:45-51.
19. Deka R, Chakraborty R, De Croo S, Rothamer S, Barton SA, Ferrell RE. Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to the apolipoprotein B gene in five human populations. *Am J Hum Genet* 1992;51:1325-33.

Additional information and reprint requests:
 Prof. Dr. P. Moreno
 Department of Animal Biology
 Section of Anthropology
 Faculty of Biology
 Avda Diagonal 645
 08028 Barcelona Spain
 Phone: 34-3-4021460
 Fax: 34-3-4110887

3.3

Int J Legal Med (2000) 113: 126–128

© Springer-Verlag 2000

SHORT COMMUNICATION

M. Gené · P. Moreno · N. Borrego · E. Piqué · A. Xifró
M. Fuentes · F. Bert · A. Corella · A. Pérez-Pérez
D. Turbón · J. Corbella · E. Huguet

Population study of Aymara Amerindians for the PCR-DNA polymorphisms HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQ α

El propósito del siguiente trabajo es aportar datos genéticos de la población Aymará del altiplano boliviano y compararlos con los de la población Quechua realizados en el artículo previo.

Las frecuencias génicas y genotípicas para ocho polimorfismos (HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 y HLA-DQ α) nucleares se han analizado en una muestra de individuos Aymará de Bolivia mediante la técnica de la PCR. No se han observado desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg en todos los sistemas estudiados. Se han hallado diferencias significativas en las frecuencias alélicas del sistema HUMVWA31A con la población Quechua previamente estudiada por Gené et al. (1998) que vive en áreas solapadas de Bolivia lo cual sugiere un cierto grado de diferenciación entre ambas poblaciones. La población Aymará constituye junto a las poblaciones Quechua y Uru-Chipaya una de las tres principales poblaciones andinas de Bolivia. Los Aymará ocupan el vasto altiplano de Bolivia con centro geográfico ubicado en el lago Titicaca. Los individuos estudiados en el presente trabajo viven en altitudes comprendidas entre los 3.500 y los 4.000 m. en las provincias bolivianas de Pacajes y Murillo (Departamento de La Paz).

Las frecuencias para los ocho sistemas de ADN se muestran en la tabla 1 (ver artículo), La distribución de los genotipos para todos los loci se hallan en equilibrio Hardy-Weinberg. La comparación con la población Quechua se ha efectuado sólo con los sistemas HLA-DQ α , YNZ22, HUMTH01 y HUMVWA31A sin hallarse diferencias estadísticamente significativas para HUMTH01 ($P = 0,7755$), YNZ22 ($P = 0,1508$), HLA-DQ α ($P = 0,7699$) pero si con el sistema HUMVWA31A ($P = 5,017E-04$), para confirmar los resultados para este locus todas las muestras se tiparon dos veces.

Si bien el estudio determina una cierta afinidad genética utilizando los citados marcadores, entre Quechuas y Aymaras. La diferencia hallada para uno de los sistemas, necesitara de posteriores estudios y el estudio de otros polimorfismos genéticos.

Parámetros estadísticos de utilidad medico forense como el poder de discriminación (PD) y la probabilidad de exclusión (CE) se han determinado a partir de las frecuencias génicas en la población Aymará.

SHORT COMMUNICATION

M. Gené · P. Moreno · N. Borrego · E. Piqué · A. Xifró
 M. Fuentes · F. Bert · A. Corella · A. Pérez-Pérez
 D. Turbón · J. Corbella · E. Huguet

Population study of Aymara Amerindians for the PCR-DNA polymorphisms HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQ α

Received: 25 February 1999 / Received in revised form: 18 May 1999

Abstract Allele and genotype frequencies for eight DNA polymorphisms (HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQ α) were determined in a population sample of Aymara Indians from Bolivia using PCR. No deviations of the observed allelic frequencies from Hardy-Weinberg equilibrium were found for all the systems studied. Significant differences in the allele frequencies were found between the Aymara and Quechua populations only for HUMVWA31A, which suggests a certain degree of genetic differentiation between the two populations.

Key words HUMTH01 · HUMVWA31A · D3S1358 · D8S1179 · D18S51 · D19S253 · YNZ22 · HLA-DQ α · Aymara

Introduction

DNA polymorphisms have been widely studied in many human populations [1, 2]. However, there is a scarcity of data for autochthonous South American Indians. The aim of this study was to report the allele frequency distributions for HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQ α in the Aymara population.

M. Gené (✉) · N. Borrego · E. Piqué · A. Xifró · J. Corbella
 E. Huguet
 Forensic Genetics Laboratory, Legal Medicine Department,
 School of Medicine, University of Barcelona, C. Casanova 143,
 E-08036 Barcelona, Spain
 e-mail: mgene@medicina.ub.es, Fax: +34-93-4035290

P. Moreno · F. Bert · A. Corella · A. Pérez-Pérez · D. Turbón
 Animal Biology Department, Section of Anthropology,
 School of Biology, University of Barcelona, Diagonal 645,
 E-08028 Barcelona, Spain

M. Fuentes
 Preventive Medicine Unit, School of Medicine,
 University of Barcelona, C. Casanova 143,
 E-08036 Barcelona, Spain

The Aymara people constitute a large South American Indian group living in the vast windy Titicaca plateau of the Central Andes of modern Peru and Bolivia. The Aymara studied live at an altitude of 3835 m in the provinces of Pacajes and Murillo in the department of La Paz (Bolivia).

Material and methods

The biological samples analysed consisted of two hairs with root bulbs taken from unrelated individuals of both sexes from the Aymara population. DNA was extracted with Chelex 100 using the method described by Walsh et al. [3]. The HLA-DQ α typing was done with the AmpliType kit. Genotyping methods used for the other PCR-DNA polymorphisms were as described in previous studies on Catalanian populations [1, 4, 5]. For the D19S253 system, the alleles were scored following the terminology used by De Stefano et al. [6].

Possible divergence from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was determined by using the exact test proposed by Guo and Thompson [7].

From a forensic point of view, the power of discrimination (PD) [8], heterozygosity value (h) [9] and the "a priori" chance exclusion value (CE) [10] were calculated. The Aymara data were compared with those from a Quechua population using a $R \times C$ contingency table χ^2 -test for homogeneity [11].

Results and discussion

Allele frequencies for the eight DNA systems studied in the Aymara population sample are shown in Table 1. The distribution of the genotypes for all loci were in Hardy-Weinberg equilibrium. The results were compared with those of Quechua Indians, previously studied by our group [12], as another important population living in the same geographic area.

The comparisons between the Aymara and Quechua have been carried out only with the four commonly published polymorphisms (HUMTH01, HUMVWA31A, YNZ22 and HLA-DQ α). No statistically significant differences were observed for HUMTH01 ($P = 0.7755$), YNZ22 ($P = 0.1508$), and HLA-DQ α ($P = 0.7699$) but significant differences were observed for the HUMVWA31A system

Table 1 Allele frequency distribution for HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQα, in Aymara population and statistical parameters for the eight systems

Allele	HUMTH01 <i>n</i> = 115	HUMVWA31A <i>n</i> = 110	D3S1358 <i>n</i> = 117	D8S1179 <i>n</i> = 115	D18S51 <i>n</i> = 104	D19S253 <i>n</i> = 114	YNZ22 <i>n</i> = 117	HLA-DQα <i>n</i> = 57
1.1								0.026
1.2								0.009
1.3								
2							0.009	
3							0.030	0.474
4							0.812	0.491
5							0.047	
6	0.217						0.021	
7	0.600					0.079	0.004	
8						0.004	0.009	
9	0.013			0.009			0.009	
9.3 + 10	0.170							
10				0.052	0.010	0.105	0.017	
11				0.048	0.005	0.140	0.013	
12				0.126	0.154	0.482	0.009	
13				0.335	0.197	0.158	0.004	
14		0.014	0.026	0.230	0.197	0.031	0.013	
15		0.041	0.603	0.170	0.111		0.004	
16		0.395	0.261	0.026	0.091			
17		0.450	0.103	0.004	0.125			
18		0.059	0.004		0.053			
19		0.036	0.004		0.034			
20		0.005			0.014			
21					0.010			
HWE exact test	<i>P</i> = 0.5136	<i>P</i> = 0.4596	<i>P</i> = 0.9603	<i>P</i> = 0.1801	<i>P</i> = 0.7088	<i>P</i> = 0.6289	<i>P</i> = 0.0701	<i>P</i> = 0.6390

Table 2 Statistical parameters of medico-legal interest (*h* heterozygosity value, *PD* power of discrimination, *CE* chance of exclusion)

System	<i>h</i>	<i>PD</i>	<i>CE</i>
HUMTH01	0.566	0.722	0.310
HUMVWA31A	0.637	0.798	0.370
D3S1358	0.560	0.744	0.308
D8S1179	0.787	0.923	0.587
D18S51	0.862	0.963	0.715
D19S253	0.707	0.880	0.493
YNZ22	0.337	0.553	0.204
HLA-DQα	0.538	0.673	0.231
Total		0.999	0.989

(*P* = 5.017E-04). To confirm the results for this locus all samples were typed twice. At the moment, there is no explanation for this difference. However, the similarities observed suggest some genetic affinities between the two groups. Thus, from a genetic point of view, except for the HUMVWA31A system, the allele distributions for the rest of the systems analysed are comparable with those observed in the Quechua population. Nevertheless, the analysis of more polymorphisms will be necessary to determine if genetic differences exist between the two groups.

For forensic purposes, statistical parameters of medico-legal interest were calculated from the gene frequencies obtained in our population (Table 2).

Acknowledgements We are grateful to the Aymara population for its generous collaboration in the present study. This work has been partially funded by a Spanish M.E.C. grant (PB96-1485)

References

1. Gené M, Huguet E, Moreno P, Sánchez C, Carracedo A, Corbella J (1996) Population study of the STRs HUMTH01 (including a new variant) and HUMVWA31A in Catalonia (north-east Spain). *Int J Legal Med* 108: 318–329
2. Pinheiro F, Pontes L, Gené M, Huguet E, Pinto da Costa J, Moreno P (1997) Population study of the HUMTH01, HUMVWA31A, HUMF13A1 and HUMFES/FPS STR polymorphisms in the North of Portugal. *J Forensic Sci* 42: 121–124
3. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506–513
4. Gené M, Huguet E, Sánchez-García C, Moreno P, Corbella J, Mezquita J (1995) Suitability of the YNZ22 (D17S5) VNTR polymorphism for legal medicine investigations in the population of Catalonia (Spain). *Int J Legal Med* 107: 222–224
5. Gené M, Piqué E, Borrego N, Carracedo A, Huguet E, Moreno P (1998) Catalonian population study of the tetranucleotide repeat loci D3S1358, D8S1179, D18S51 and D19S253. *Int J Legal Med* 112: 75–77
6. De Stefano F, Casarino L, Costa MG, Bruni G, Mannucci A, Unsel M, Hiesel R, Canale M (1996) Analysis of a short tandem repeat locus on chromosome 19 (D19S253). *Int J Legal Med* 108: 256–258
7. Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361–372

8. Fisher RA (1951) Standard calculations for evaluating a blood group system. *Heredity* 5: 95–102
9. Nei M, Roychoudhury AK (1974) Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379–390
10. Ohno Y, Sebetan MI, Akaishi S (1982) A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles. *Forensic Sci Int* 19: 93–98
11. Fisher RA (1954) *Statistical methods for research workers*. Oliver and Boyd, Edinburgh
12. Gené M, Fuentes M, Huguet E, Piqué E, Bert F, Corella A, Pérez-Pérez A, Corbella J, Moreno P (1998) Quechua Amerindian population characterized by HLA-DQ α , YNZ22, 3'APOB, HUMTH01, and HUMVWA31A. *J Forensic Sci* 43: 403–405

3.4



Project
MUSE[®]

Today's Research. Tomorrow's Inspiration.

Major Mitochondrial DNA Haplotype Heterogeneity in Highland and Lowland Amerindian Populations from Bolivia

Bert, Francesc.
Corella, Alfons.
Gene, Manel.
Perez-Perez, Alejandro.

[More](#)

Human Biology, Volume 73, Number 1, February 2001, pp. 1-16 (Article)



Published by Wayne State University Press
DOI: 10.1353/hub.2001.0001

Después de los dos primeros artículos donde se analizaron sistemas del ADN nuclear en poblaciones andinas, se quiso comparar éstas con poblaciones de la región del Piedemonte, una zona de Serranías de las últimas estribaciones andinas de Bolivia con la intención de determinar si la afinidad genética de éstas poblaciones era mayor con las poblaciones andinas o bien con las amazónicas. Para realizar la comparación se utilizó esta vez el ADN mitocondrial,

El estudio aporta las frecuencias de los haplogrupos del ADN mitocondrial de una muestra de 233 individuos de ocho poblaciones nativas de Sudamérica que viven en el Departamento del Beni (Bolivia) una región multiétnica caracterizada por su marginalidad geográfica y por una historia demográfica compleja (Denevan 1966; Block 1980). En el estudio se incluyen seis poblaciones de las que, hasta el momento no había caracterización genéticamente pertenecientes a los tres principales grupos lingüísticos de Sudamérica: el

Andino, el Ecuatorial-Tucanoano y el Ge-Pano-Caribe todos ellos ubicados en el área de Moxos del Departamento del Beni.

En el presente resumen sólo se realiza el análisis y comparación de las poblaciones andinas con las del Piedemonte.

Las muestras consisten en bulbos pilosos de cabello y muestras de sangre en papel de filtro recogidas “*in situ*” a partir de individuos no emparentados de los grupos étnicos: Aymará, Quechua, Chimane y Mosetén. El grado de parentesco se realizó en el mismo lugar de recogida a partir de una encuesta demográfica previa a la obtención de la muestra. La recolección fue siempre voluntaria. En el caso de los bulbos pilosos, éstos fueron guardados en tubos eppendorf estériles.

Las muestras de sangre se pusieron en papel de filtro de 5 mm (Rubilabor 589³ blue ribbon) se secaron al aire y guardaron en tubos eppendorf estériles. La extracción de ADN se realizó usando ChelexTM 100 tal y como describe Walsh et al. (1991). Todas las muestras fueron tipadas usando enzimas de restricción característicos para cada haplogrupo. Los primers o cebadores utilizados son los descritos por Wrischnik et al. (1987). El material fue amplificado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y determinado por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Las observaciones se hicieron con luz ultravioleta a 260 nm.

Para determinar la variabilidad genética se realizaron diversos análisis estadísticos: el índice de diversidad de Nei (1987), el estadístico $\hat{\theta}$ Weir (1990) y el análisis de la varianza molecular (AMOVA) Excoffier et al. (1992).

La comparación entre poblaciones se realizó mediante agrupaciones o clusters basados en criterios: geográficos, genéticos, lingüísticos e históricos. La afinidad genética entre poblaciones se realizó a partir de las frecuencias obtenidas de los diferentes haplogrupos, la distancia genética usada para construir la matriz de distancias entre poblaciones dos a dos fue la de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) ya que ésta se ajusta más a la historia demográfica de las poblaciones Sudamericanas. A partir de las distancias genéticas se construyeron árboles UPGMA utilizando el programa PHYLIP, Felsenstein (1993).

Como resultados podemos decir que:

- No se hallaron haplotipos combinados (más de un haplogrupo por individuo)
- Sólo un 2,6% de un total de 233 muestras no pertenecieron a alguna de los principales haplogrupos de las poblaciones nativas de América. Éstas deben ser el

resultado del mestizaje con poblaciones de origen caucásico. Los 6 individuos de éstas características fueron eliminados del análisis genético posterior.

- Los haplogrupos más comunes en las cuatro poblaciones estudiadas fueron los haplogrupos A y B.
- La frecuencia del haplogrupo B en la población Aymará es muy alto hecho previamente observado en otros estudios Merriwether et al. (1995)
- La población Quechua presenta una frecuencia elevada del haplogrupo B pero los haplogrupos A y C también están presentes, este hecho no se había constatado en otros estudios similares realizados con otras poblaciones Quechua Merriwether et al. (1995)
- Los valores más bajos de diversidad genética, utilizando el índice de Nei fueron los hallados en la población Aymará ($h = 0,119$) mientras que los Mosestén alcanzaron valores mucho mas altos ($h = 0,514$)
- El análisis AMOVA indicó una mayor afinidad entre las poblaciones de habla Andina (Aymará y Quechua) y entre las poblaciones de habla Pano (Chimane y Mosestén)
- La $\hat{\theta}$ de Weir indicó que los criterios que separan mejor las agrupaciones de poblaciones o clusters eran los criterios obtenidos a partir de la distancia de los árboles UPGMA y los criterios histórico-lingüísticos
- Los criterios geográficos parece que tengan un peso menor a la hora de agrupar las poblaciones.
- Los valores de diversidad genética hallados en el departamento del Beni fueron similares a los hallados en el conjunto de todo el continente Sudamericano.
- La población Aymará parece el grupo mas aislado si se compara con las otras poblaciones.
- Las similitudes entre Aymará y Quechua deben ser el resultado de un flujo genético que ha tendido lugar durante milenios en la región andina, de todas formas en el presente estudio existe una cierta influencia de la poblaciones Pano Chimane y Mosestén en la población Quechua lo cual indicaría un contacto entre la población Quechua pre-amazónica con las de habla Pano.
- El análisis AMOVA, que es útil para el análisis genético cuando interactúan factores geográficos, lingüísticos e históricos nos sitúa en un contexto donde los factores

geográficos tienen poca importancia comparados con factores culturales como la lengua y la historia reciente de estas poblaciones.

Los autores agradecen la colaboración al Dr. J Castro del Hospital de San Ignacio de Mojos a la Dras Greet Diltiens, la Dra. Roser Montagut la cooperación en la recogida de muestras, también agradecemos la ayuda suministrada por el Laboratorio de Biología “San Calixto” de La Paz.

Major Mitochondrial DNA Haplotype Heterogeneity in Highland and Lowland Amerindian Populations from Bolivia

FRANCESC BERT,¹ ALFONS CORELLA,¹ MANEL GENÉ,² ALEJANDRO PÉREZ-PÉREZ,¹ AND DANIEL TURBÓN¹

Abstract This study provides the frequencies of four mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups of 233 native South Amerindians in eight populations living in the Beni Department of Bolivia, including six populations not previously studied. Linguistically, these populations belong to the three principal South Amerindian language stocks, Andean, Equatorial-Tucanoan, and Ge-Pano-Carib. Frequency analyses under geographic, historic, linguistic, and genetic configurations using the $\hat{\theta}$ statistic of Weir (Weir 1990) and analysis of molecular variance (AMOVA) show similar results. Results are also similar when phenetic cluster is used. Aymara belongs almost exclusively to haplogroup *B*, Quechua- and Mosesten-speaking tribes belong to haplogroups *A* and *B*, but the first tribe presents high frequencies of haplogroup *B*. Yuracare, Trinitario, and Ignaciano exhibit high frequencies of *A*, *B*, and *C* haplogroups, and the Movima present a large proportion of haplogroup *C*. There is some correspondence between mtDNA haplogroup frequencies and language affiliation and historical connections, but less so with geographic aspects. The present study provides a context for understanding the relationship between different Amerindian populations living in a multiethnic area of Bolivia.

From the earliest studies on mitochondrial DNA (mtDNA) diversity among native Americans, research has been ongoing in an effort to determine the origin of the indigenous peoples of the Americas (see Bonatto and Salzano [1997] for a review of the literature). Little agreement has been reached, though, concerning the relationship between the distribution of the four founding lineage haplotypes in native Americans and the number of waves of migration to the New World (Merriwether and Ferrell 1996). Few detailed

¹ Secció Antropologia, Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

² Departament de Medicina Legal, Laboratori de Genètica Forense, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Human Biology, February 2001, v. 73, no. 1, pp. 1–16.
Copyright © 2001 Wayne State University Press, Detroit, Michigan 48201-1309

KEY WORDS: MtDNA, HAPLOGROUPS, AMERINDIANS, AYMARA, CHIMANE, IGNACIANO, MOSETEN, MOVIMA, QUECHUA, TRINITARIO, YURACARE

studies have been made of the genetic haplogroup variability in reduced geographical areas of South America. Some studies have been done in small regions of Brazil (Ward et al. 1996), Panama (Kolman and Bermingham 1997; Batista et al. 1995), and Costa Rica (Santos et al. 1994), but not in Bolivia.

The highlands of Bolivia constitute a natural path for migration from northern areas into the coastal South and into the lowlands in Amazonia. No genetic studies of indigenous peoples living in the Bolivian lowlands have been carried out, however. The "Llanos de Mojos" is a region of the Bolivian lowlands located in the Beni Department. This area is particularly interesting from many points of view: the great multiethnicity of the human populations that live there, their geographic marginality, and their unique demographic history (Denevan 1966; Block 1980). Before the arrival of the first missionaries, the estimated native population size was 200,000, but after one hundred years this number declined dramatically.

What is known of the history of the "Llanos de Mojos" region was written by the Jesuits and Franciscans. These missionaries founded large villages or settlements, called "reductions," for the religious and cultural education of the Indians. Several tribes have mixed there since 1682. In 1746 the Jesuits were expelled from the Llanos de Mojos, and the reductions were transformed into the present villages of San Ignacio and Trinidad, where Ignaciano and Trinitario populations live. From Jesuit ethnographic records, Saignes (1985) showed that the Inca had occupied the oriental Andean range and the upper and middle valleys of the Beni river, where the Chimane and Mosenen Indians live at present. However, no further information is available about the importance of the interaction between the Inca and the local populations in the Llanos de Mojos.

The present study provides data on the frequencies of the four major mtDNA haplogroups in eight Amerindian populations, six of them not previously studied. Their genetic affinities are studied, taking into account the different hypotheses on the colonization of the South American continent. This study will be useful not only for understanding the complex history of the peopling of Bolivia, but also for extending our knowledge on the distribution of mtDNA variation among native South Americans.

Materials and Methods

Samples. All the populations studied live in Llanos de Mojos. The sample includes eight populations: Aymara, Quechua, Chimane, Mosenen, Yuracare, Ignaciano, Trinitario, and Movima (estimated sizes of these populations are shown in Table 1). Other populations living in the Beni Department include Itonama, Canichana, Baure, More, Cavineño, Esse-Ejja, Chacobo, Pacahuara, and Cayuvaba, who speak different languages, enhancing the greatly varied ethnicity of this region. The Aymara and Quechua may be considered colo-

Table 1. Haplogroup Frequencies, Linguistic Classification, and Current Sizes of the Populations Studied

Population	Relative Frequency of Haplogroups					Sample Size	Clearly Related Languages ^a	Amerind Language Subgroup ^b	Estimated Population Living in Beni Department ^c
	A	B	C	D	Other				
Aymara	0	0.939	0.030	0.030	0	33	Aymaran	Andean	Not available
Quechua	0.156	0.75	0.094	0	0	32	Quechuan	Andean	Not available
Chimane	0.390	0.537	0.049	0	0.024	41	Mosetenan	Ge-Pano-Carib	3,800-4,500
Mosetén	0.4	0.55	0	0	0.05	20	Mosetenan	Ge-Pano-Carib	1,200-1,400
Ignaciano	0.182	0.364	0.409	0	0.045	22	Arawakan-Maipuran	Equatorial-Tucanoan	6,400
Trinitario	0.143	0.4	0.371	0.029	0.057	35	Arawakan-Maipuran	Equatorial-Tucanoan	10,000
Movima	0.091	0.091	0.636	0.182	0	22	Unclassified	Equatorial-Tucanoan	5,200
Yuracaré	0.393	0.321	0.214	0.036	0.036	28	Unclassified	Equatorial-Tucanoan	2,800-3,000
Total	0.219	0.519	0.206	0.030	0.026	233			Not available

a. Language group includes languages closely and clearly related to a greater group, according to Ruhlen's classification (1991).

b. Major subgroups of Amerindian languages in the same classification (Ruhlen 1991).

c. Estimated sizes of this population living in the Beni Department (Diez 1996).

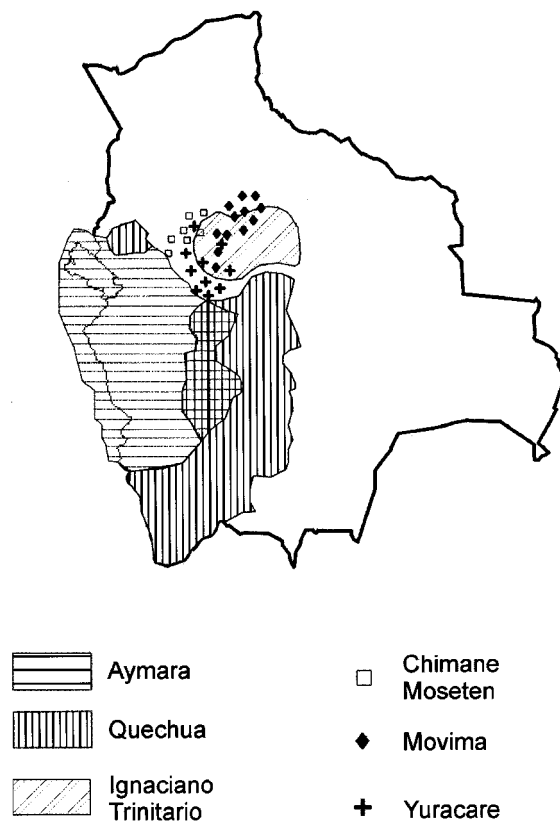


Figure 1. Geographical location of the populations studied in Bolivia.

nizers in the area, since they originally occupied the Andean highlands. Chimane, Moseten, and Yuracare live in the Andean foothills, whereas the Ignaciano, Trinitario, and Movima occupy the seasonally overflowing savanna. However, this distribution is merely tentative, since, in fact, their geographic areas of dispersion overlap (Figure 1). A total of 233 individuals with known ethnic affiliation were studied. Ethnicity was assigned to individuals based on self-identification as recorded from interview data. Only unrelated individuals were studied. Family relationships were determined in situ by a demographic survey done at the same time that genetic samples were obtained. Most of the sample sources were bulb hairs, but some blood stains were also obtained. Pulled hairs were stored in sterile tubes until analysis, and blood stains were obtained on 5-mm filter paper (Rubilabor 589³ blue ribbon) and air-dried for several minutes before storage in sterile tubes.

Polymorphism Typing. DNA extraction was performed using Chelex™ 100, as described by Walsh et al. (1991). All samples were typed using specific mtDNA restriction sites for diagnosis of haplogroups *A*, *B*, *C*, and *D*. These haplogroups are defined by restriction size or length polymorphism: (*A*) *Hae*III site gain at nucleotide position (np) 663, (*B*) 9-base-pair deletion in the COII-tRNA intergenic region (region V), (*C*) *Alu*I site gain at nucleotide position (np) 13262 and *Hinc*II loss at np 13259, and (*D*) *Alu*I site loss at np 5176.

The primers used were previously described in Wrischnik et al. (1987). For each haplogroup these primers are: (*A*) H708 (5'-TGAACCTCACTGGAACG-3') and L630 (5'-ATGTTTAGACGGGCTC-3'); (*B*) H8366 (5'-TTTCACTGTAAAGAGGTGTTGG) and L 8150 (5'-CCGGGGGTATACTACGG-3'); (*C*) H13305 (5'-GTGCAGGAATGCTAGG-3') and L13204 (5'-ACTCTGTTCGCAGCAG-3'); (*D*) H5237 (5'-CAAAAAGCCGGTTA GC-3') and L5147 (5'-AAACTCCAGCCACG-3')

Polymerase chain reaction amplifications were done in a total volume of 25 µL, containing 2.5 µL of 10X reaction buffer, 0.2 mM of each dNTP, 1 µL W-1 (BRL), 1.5 mM Cl₂Mg, 1 µL of each primer (approximately 0.2 mM stock), 0.25 units of *Taq* polymerase (BRL), and 5 µL of template DNA extracted from bulb hairs or 1 µL of DNA extracted from blood stains. Initial denaturation was at 94°C for 4 min, followed by 30 cycles of 94°C denaturation for 1 min, 55°C annealing for 1 min, 72°C extension for 1 min, and a final extension cycle of 72°C for 5 min. From the reaction tubes, 8 µL of the amplified products were resolved by electrophoresis on 2% agarose gel containing ethidium bromide. The remaining 17 µL were digested with haplogroup-specific restriction enzymes for 1 h 30 min at 37°C. The restriction products were electrophoresed in a 4% agarose gel, stained with ethidium bromide, and observed under 260 nm UV light to determine if the amplified fragment had been restricted by the enzyme.

Statistical Analyses. Several statistical analyses were carried out to characterize the genetic variability of the studied groups. The mtDNA diversity index (*h*) by Nei (1987) was calculated as follows: $h = (n/n - 1)(1 - \sum x_i^2)$, where *n* is the number of gene copies in the sample, *k* is the number of haplotypes and *x_i* is the sample frequency of the *ith* haplotype. This statistic was obtained for all the populations studied. In order to determine the importance of different factors that conform the relationship between these groups, $\hat{\Theta}$ statistic (Weir 1990) and analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992) were obtained. The $\hat{\Theta}$ statistic is equivalent to Wright's *F_{ST}*, adjusted for sampling biases (Weir 1990). Estimated values of $\hat{\Theta}$ were calculated as follows:

$$\hat{\Theta} = T_1/T_2, \text{ with} \quad (1)$$

$$T_1 = S_A^2 - \frac{1}{\bar{n} - 1} \left[\hat{p}_A(1 - \hat{p}_A) - \frac{r - 1}{r} S_A^2 \right],$$

$$T_2 = \frac{n_c - 1}{\bar{n} - 1} \hat{p}_A (1 - \hat{p}_A) + \left[1 + \frac{(r - 1)(\bar{n} - nc)}{\bar{n} - 1} \right] \frac{S_A^2}{r}, \text{ where}$$

$$S_A^2 = \frac{1}{(r - 1)\bar{n}} \sum_i n_i (\hat{p}_{Ai} - \hat{p}_A)^2 \text{ for } r \text{ populations,}$$

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^r n_i}{r} \text{ and } nc = \frac{1}{r - 1} \left(\sum_{i=1}^r n_i - \frac{\sum_i n_i^2}{\sum_i n_i} \right),$$

$$\hat{p}_A = \frac{\sum_{i=1}^r n_i \hat{p}_{Ai}}{\sum_{i=1}^r n_i} \text{ and } \hat{p}_{Ai} = \frac{1}{n_j} \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij},$$

in a sample of n_i genes from the i^{th} population, and for gene j in a population i the variable x_{ij} can be defined as $x_{ij} = 1$ (if gene is allele a ; 0 if gene is not allele a). Each haplogroup was treated as an allele, so that p_{Ai} is the frequency of haplogroup A in populations i , p_{Bi} is the frequency of haplogroup B in populations i , and so on.

An overall estimate of $\hat{\Theta}$ was determined by summing the $\hat{\Theta}$ estimated for each of the four haplogroups:

$$\hat{\Theta} \text{ overall} = \frac{\sum_{u=1}^4 T_1}{\sum_{u=1}^4 T_2} \text{ for the } u^{\text{th}} \text{ allele.} \quad (2)$$

These statistics were initially calculated for the eight populations considered, as well as for the whole Amerindian continent (Table 2). Clusters of populations were made using geographic, genetic distance, linguistic, and historic criteria, and these statistics were computed for each one of the five sets of clusters obtained (Table 3).

1. *Geographic criteria (Andean versus Amazonian populations)*. Two groups were formed according to their original territory. Bolivian populations are clearly divided into two geographical areas divided by the Andean Mountains. Even though all populations studied live in the Amazonian region, the Aymara and Quechua may be considered colonizers in the area, since they originally occupied the Andean highlands and the principal stock of these populations remains there.
2. *Genetic distance criteria*. Four groups were derived from the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) tree, according to the four principal branches of this tree.

MtDNA Haplotype Heterogeneity in Bolivia / 7

Table 2. MtDNA Diversity (h ; Nei 1987) of All Populations Studied

<i>Population</i>	<i>Population Names (Abbreviated)</i>	<i>h ± std</i>
Aymara	<i>(Aym)</i>	0.119 ± 0.076
Chimane	<i>(Chi)</i>	0.549 ± 0.041
Ignaciano	<i>(Ign)</i>	0.667 ± 0.050
Moseten	<i>(Mos)</i>	0.515 ± 0.052
Movima	<i>(Mov)</i>	0.571 ± 0.106
Quechua	<i>(Que)</i>	0.417 ± 0.096
Trinitario	<i>(Tri)</i>	0.661 ± 0.043
Yuracare	<i>(Yur)</i>	0.698 ± 0.042
Total		0.631 ± 0.021
Total North America		0.668

(Lorenz et al. 1996)

3. *Linguistic criteria.* According to the Amerindian language classification (Ruhlen 1991), there are four major groups of Amerindian languages in South America, three of which are spoken in the Beni Department by the studied populations. We have used those three major groups to classify our populations. At one level, those major stocks are divided into many related languages that have been used for a more specific analysis.
4. *Historic criteria.* Five groups were formed based on two historical events. The first one takes into account the expansion of the Incan Empire from the Andean region to the Chimane and Moseten habitats. The Quechua are considered descendants of the Incas. The second event refers to the more recent Jesuit reductions in Llanos de Mojos, where the Ignaciano and Trinitario populations were joined during the 18th century.

The comparison of the $\hat{\Theta}$ values for each clustering of populations with the initial value obtained for the whole sample makes it possible to determine if the heterogeneity among the clusters increases, as is expected when the clustering of samples is based on valid assumptions (Lorenz and Smith 1996). The AMOVA also analyzes the heterogeneity among clusters using the percentage of variance resulting from diversity within populations, among groups of populations, or among populations within a group. A permutation resampling procedure was used to confirm the statistical significance of the analyses (Excoffier 1992).

The genetic affinities among populations were computed using DNA distances derived from the haplogroup frequencies obtained. The genetic dis-

Table 3. Hierarchical Analysis under Different Criteria. AMOVA and $\hat{\theta}$ Values

Groups	AMOVA Values (%)			$\hat{\theta}$ (Weir)
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	
One group with all populations		19.9	80.1*	0.199
One group without Aymara and Movima ^a	8.4	91.6*		0.206
Whole American continent ^b		20.7	79.4	
Clustering criteria				
I. Geographic	15.6 (<i>p</i> = 0.009)	10.9 *	73.5 *	0.191
II. UPGMA distance	20.8 (<i>p</i> = 0.006)	2.6 *	76.5 *	0.222
III. Major Amerindian Languages	19.3 (<i>p</i> = 0.006)	4.6 *	76.1 *	0.212
IV. Clearly related languages	23.9 (<i>p</i> = 0.004)	-2.7 *	78.8 *	0.217
V. Historic	21.1 (<i>p</i> = 0.005)	1.3 *	77.6 *	0.220

Notes: Variance components: *a*-among groups; *b*-among populations within group; *c*-within populations.

**p* < 0.0001.

a. Values obtained considering only 6 populations, excluding the Aymara and Movima populations.

b. Data obtained from Bonato and Salzano 1997; Horai et al. 1993; Lorenz and Smith 1996; Merriwether et al. 1995b; Schurr et al. 1990; Torroni et al. 1993 and 1994.

Clusters are made as follows (population names are abbreviated as in Table 2):

I. Andean (*Aym*, *Que*); Amazonian (*Chi*, *Ign*, *Mos*, *Mov*, *Tri*, *Yur*)

II. Clusters: (*Aym*); (*Chi*, *Mos*, *Que*); (*Ign*, *Tri*, *Yur*); (*Mov*)

III. Andean (*Aym*, *Que*) Ge-Pano-Carib (*Chi*, *Mos*); Equatorial-Tucanoan (*Ign*, *Tri*, *Mov*, *Yur*)

IV. Aymaran (*Aym*); Quechuan (*Que*); Mosestenan (*Chi*, *Mos*); Yuracare (*Yur*); Movima (*Mov*); Mojo (*Ign-Tri*)

V. (*Aym*); (*Chi*, *Mos*, *Que*); (*Ign*, *Tri*); (*Mov*); (*Yur*)

tances by Nei (1972), Reynolds et al. (1983), and Cavalli-Sforza and Edwards (1967) were calculated. Although they all gave essentially the same results, the chord distance by Cavalli-Sforza and Edwards (1967) was chosen to build the matrix distance between populations. It is in better accordance with the human demographic history in South America than the others, it allows for differences in population sizes among groups, and it does not require constant population sizes through time (Cavalli-Sforza and Edwards 1967). UPGMA trees were constructed using the PHYLIP genetic package (Felsenstein 1993).

Results

A total of 233 samples were typed for all four major mtDNA haplogroups. The frequencies of each haplogroup by population are shown in Table

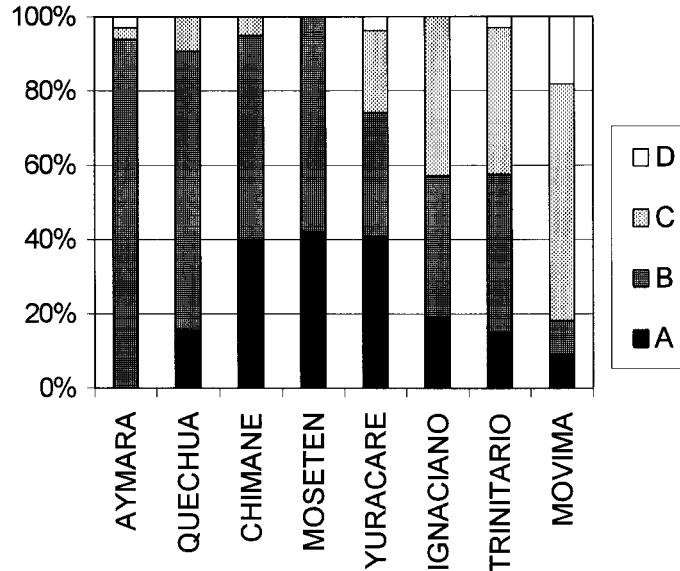


Figure 2. Distribution of mtDNA haplogroups A, B, C, and D by population. The groups are sorted in order to display a general cline but not by geographical location.

1. No compound haplotypes (positive restriction for more than one haplogroup) were found. Only six individuals (2.6%) did not belong to one of the four principal Native American haplogroups (A, B, C, or D) and were therefore classified as “others.” They may be the result of admixture with Caucasian populations (Torrioni et al. 1993), or belong to some rare Native American haplogroup (Bailliet et al. 1994). These samples were removed from their respective groups, and the frequencies of the four principal haplogroups were re-scaled to unity in these groups for further analyses. Figure 2 shows the cumulative haplogroup frequencies by populations. Haplogroup B is the most common in the studied area (51.9%), and haplogroup D is the least common (3%). Haplogroups A (21.8%) and C (20.6%) show similar values.

A clear highland-lowland gradient in the frequencies of B and C haplogroups for the different populations can be observed (Figure 2). Haplogroup B shows high frequencies in the Andean region but decreases in the lowlands, whereas for haplogroup C the highest frequencies are observed in the lowlands, with a decrease in the highlands. In the Aymara, haplogroup B is by far the most frequent, as has also been described in other Aymara samples (Merriwether et al. 1995a). In the Movima sample the prevailing haplogroup is C, whereas in the rest of populations at least two haplogroups share similar importance. In the Chimane and Mosesten, haplogroups A and B are the most frequent, whereas in the Ignaciano and Trinitario, B and C are preponderant.

The Yuracare have moderate frequencies of haplogroups *A*, *B*, and *C*. Finally, the Quechua show a higher frequency of haplogroup *B*, but haplogroups *A* and *C* are also present, a finding that contrasts with those of other studies of Quechua populations (Merriwether et al. 1995a), which show higher frequencies of haplogroups *A* and *D*.

MtDNA Diversity. The diversity indices (h) by Nei (1987) measuring mtDNA diversity for all the groups considered are shown in Table 2. The Aymara show the lowest index of diversity ($h = 0.119$), and the rest of the populations show values of h between 0.698 (Yuracare) and 0.514 (Moseten). The diversity index of the whole population from the Beni area is $h = 0.630$ ($n = 233$), a value similar to that obtained for the joint sample of all Amerindians populations ($h = 0.697$). This value was calculated by us for 1877 individuals from 52 ethnic groups using published data (Bonatto and Salzano 1997; Horai et al. 1993; Lorenz and Smith 1996; Merriwether et al. 1995b; Schurr et al. 1990; Torroni et al. 1993 and 1994).

AMOVA Analysis. The analysis of molecular variance may be used at different hierarchical levels: considering whole populations in only one group; considering groups of populations under different arbitrary assumptions; and, finally, comparing each pair of populations to determine if there is significant interpopulation variance and if they are genetically distinguishable.

At the first level, the AMOVA (Table 3) shows a significant interpopulation variability between the eight Beni populations, with 80.1% of the total variance due to within-population differences and only 19.9% due to among-population differences. All the between-group and within-group variability values obtained are similar to those obtained for the whole Amerindian continent. If the Aymara and Movima are excluded from the analysis, the within-group variability increases from 80.1% to 91.6%, and the among-populations variance decreases from 19.9% to 8.4%, indicating that these two groups are responsible for most of the variability observed.

The variance observed in the distribution of four principal haplogroup frequencies can be partitioned into three components: (1) variance within populations, (2) variance among groups of populations, and (3) variance among populations within a group (Excoffier et al. 1992). Most of the variance observed in the frequency distribution of the four principal haplogroups is due to variance at the intrapopulation level.

At the interpopulation level, higher values of variance among groups of populations, combined with lower values of variance among populations within a group, indicates the reliability of the clustering criteria. Under this assumption, the best values are obtained when six clusters of closely related linguistic groups (Ruhlen 1991) are considered. If only three linguistic clusters are considered (three subgroups of major Amerind languages), the het-

Table 4. AMOVA Values between Each Pair of Populations

	<i>Aymara</i>	<i>Chimane</i>	<i>Ignaciano</i>	<i>Moseten</i>	<i>Movima</i>	<i>Quechua</i>	<i>Trinitario</i>	<i>Yuracaré</i>
Aymara		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0088	<0.0001	<0.0001
Chimane	29.22		0.0088	0.8162	<0.0001	0.0439	0.0009	0.1437
Ignaciano	42.22	12.81		0.0137	0.0342	0.0019	0.9619	0.2082
Moseten	35.45	-3.66	0.3296		<0.0001	0.0909	0.0127	0.1212
Movima	35.26	36.65	0.2134	0.7666		<0.0001	0.0117	<0.0001
Quechua	8.41	6.99	0.1234	0.1127	0.5006		0.0059	0.0039
Trinitario	33.72	12.01	0.0229	0.3358	0.1484	0.1198		0.1037
Yuracaré	41.83	0.0836	0.0753	0.1954	0.2338	0.1378	0.0615	

Note: The bottom left of the matrix gives the interpopulation AMOVA values between each pair of populations. The top right of the matrix gives the p value of significance tested using a resampling permutation procedure (1000 permutations) (Excoffier et al. 1992).

erogeneity levels decrease a little. The historical criteria and the UPGMA distance also fall under valid assumptions. Groups generated with geographic criteria do not have significant differences between them ($p = 0.084$), thus invalidating these criteria.

Finally, AMOVA was applied to each pair of populations. Most of the comparisons show significant differences, with some exceptions (Table 4). The populations that form a clear linguistic cluster do not differ significantly from each other. The significance of the interpopulation variance between Trinitario and Ignaciano ($p = 0.962$), and between Chimane and Moseten ($p = 0.816$) reveals that, at this level, both pairs of populations are genetically indistinguishable. The Yuracare, placed in an intermediate position, only show significant differences when they are compared to the Movima, Quechua, and Aymara. Neither were there significant differences between the Quechua and Moseten populations ($p = 0.091$). The Movima and Aymara show significant differences in haplogroup frequencies when compared with all the other groups.

$\hat{\Theta}$ Analysis. The overall $\hat{\Theta}$ value obtained for a single group, including all populations studied, was $\hat{\Theta} = 0.199$, similar to that obtained for the whole continent ($\hat{\Theta} = 0.206$). Intergroup heterogeneity varies depending on how the populations are clustered prior to estimating $\hat{\Theta}$. If two geographic clusters, dividing Andean from Amazonian populations, are considered, the $\hat{\Theta}$ obtained was 0.191 (smaller than the initial value). The analysis based on six linguistic groups gives a value of $\hat{\Theta} = 0.217$, which decreased to $\hat{\Theta} = 0.212$ when the three major linguistic subfamilies (Andean, Ge-Pano-Carib, and Equatorial-Tucanoan) were considered (Ruhlen 1991). The historical clustering criteria yield a $\hat{\Theta}$ value of 0.220, indicating the historic relationship be-

Table 5. Distance Matrix between Groups Using Cavalli-Sforza and Edwards (1967) Method

	<i>Aymara</i>	<i>Chimane</i>	<i>Ignaciano</i>	<i>Moseten</i>	<i>Movima</i>	<i>Quechua</i>	<i>Trinitario</i>
Chimane	0.3230						
Ignaciano	0.3838	0.1598					
Moseten	0.3500	0.0338	0.3296				
Movima	0.6596	0.5431	0.2134	0.7666			
Quechua	0.1431	0.0524	0.1234	0.1127	0.5006		
Trinitario	0.3055	0.1739	0.0229	0.3358	0.1484	0.1198	
Yuracaré	0.4331	0.0836	0.0753	0.1954	0.2338	0.1378	0.0615

tween Quechua- and Moseten-speaking tribes (Saignes 1985). The value obtained for the genetic clustering is $\hat{\Theta} = 0.222$ for four clusters, which indicates a fair agreement with the linguistic and historic criteria.

Genetic Distance. The distance matrix derived from the haplogroup frequencies, using the Cavalli-Sforza and Edwards (1967) genetic distance for the populations, is shown in Table 5. The UPGMA tree obtained from these distances is shown in Figure 3. The most distinct groups in the plot are the Movima and Aymara, both having one preponderant haplogroup (*C* and *B*, respectively). The cluster formed by Chimane, Moseten, and Quechua share haplogroups *A* and *B*, and the cluster formed by Ignaciano and Trinitario share haplogroups *B* and *C*.

Discussion

The populations considered here show great genetic and linguistic heterogeneity despite currently living in neighboring areas of the same latitude. Actually, the multiethnicity of the Beni area is reflected by the diversity values (h , Nei 1987) for this area, which are similar to those observed for the whole of the Amerindian populations. The Trinitario-Ignaciano and Chimane-Moseten groups cluster in the UPGMA genetic tree, suggesting that they come from the same genetic source, which is consistent with their related languages. However, the recent history of these populations indicates a not-so-recent ancestry. The Trinitario and Ignaciano belong to the Macro-Arawak equatorial language stock; their past can be traced back only as far as when they were confined and protected in reductions by the Jesuits in the 17th century. Little is known about the origin of the Chimane and Moseten populations, which speak the Pano language from the Ge-Pano stock, except that they were partially influenced by the Inca culture. The Aymara and Quechua are Andean populations, as evidenced by their geography and their languages,

MtDNA Haplotype Heterogeneity in Bolivia / 13

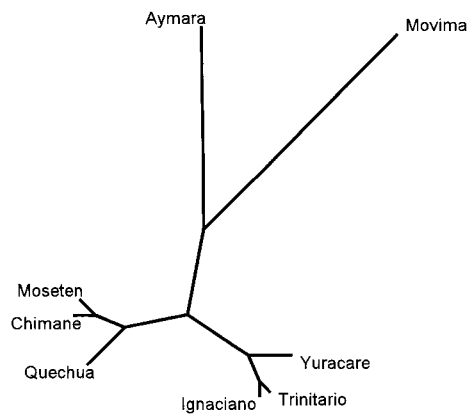
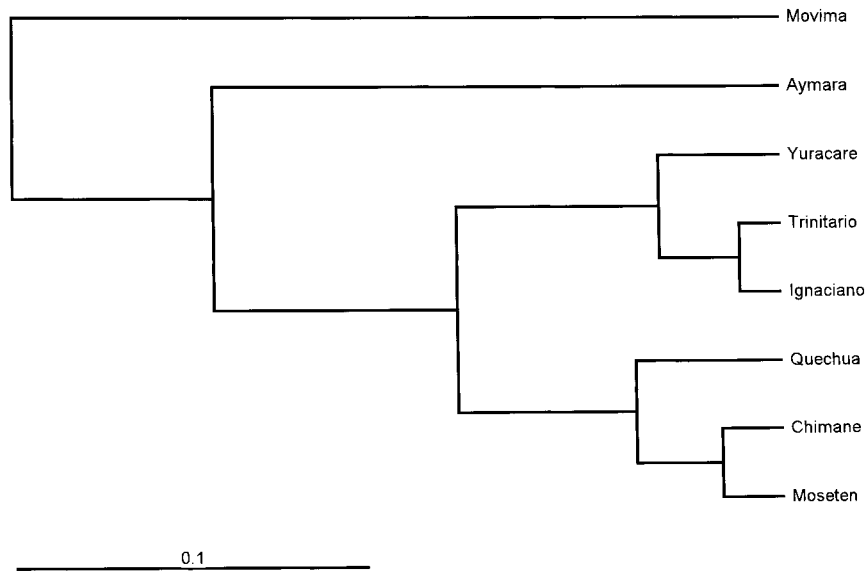


Figure 3. UPGMA trees built using chord distance from Cavalli-Sforza and Edwards (1967), phylogram, and radial form.

but the relationships between them remain unclear. The Movima lived in the northern savanna, near Santa Ana de Yacuma, until they moved southward, in pre-Columbian time, and now overlap with the Arawak people, who arrived recently in the Llanos de Mojos.

The AMOVA presented here confirm the aforementioned high genetic variability. As for intergroup genetic relationships, when Aymara and Movima are removed from the analyses, the percentage of between-group variance decreases drastically, and the rest of the samples—Quechua, Mosenen, Chimane, Yuracare, Ignaciano, and Trinitario—cluster together. The haplogroup frequencies in Figure 2 show that the Aymara and Movima are probably the most isolated groups in this study. On the other hand, the similarities observed among the rest of the groups might be the result of intense genetic flow. The AMOVA and $\hat{\Theta}$ analyses are useful for genetic analysis when geographic, linguistic, and historic factors interact (Excoffier et al. 1992). From our data, it appears that geography was not a principal factor in genetic differentiation, despite the mountains being an important barrier. In fact, the genetic similarities observed here between the two Andean populations, Aymara and Quechua, may well be due to significant genetic flow between them. Other studies, though, show greater similarities between Aymara and Quechua than those observed here, perhaps because of the genetic influence of the Chimane and Mosenen upon the Quechua sample studied here.

Linguistic and historic components have been important in the recent demographic dynamics of the Beni area. They satisfactorily explain the genetic affinities between the populations studied. However, the three major South Amerindian linguistic stocks represented in the area (Ruhlen 1991) are less correlated with the genetic variability observed than when the six linguistic groups (Aymaran, Quechuan, Mosenenean, Movima, Yuracare, and Mojo) are considered (Table 1). The high level of linguistic and genetic variability observed in the reduced area of the Beni Department suggests that the peopling of the Bolivian lowlands was a complex process. The differentiation between highland and lowland populations detected in this study might reflect separate evolutionary histories. However, important levels of genetic flow between indigenous populations from the three different ecohabitats (Andean, pre-Andean hills, and savanna lowlands) cannot be discarded, as indicated by the similarities found among the Trinitario, Ignaciano, Yuracare, Chimane, Mosenen, and Quechua, despite their different habitats and languages. The differences in the mitochondrial haplogroups found in the Beni area are in agreement with the linguistic and ethnic diversity of the populations studied.

Acknowledgments This study was funded by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia through DGICYT Projects PB-93-0021 and PB-96-1485. We are grateful to J. Castro of San Ignacio Hospital, Greet Diltiens, and Roser Montagut for their co-

operation in the collection of samples. We are also grateful to J. Cerdà of Laboratorio de Biología “San Calixto” from La Paz, Bolivia, for his help.

Received 16 April 1999; revision received 27 June 2000.

Literature Cited

- Bailliet, G., F. Rothhammer, F.R. Carnese et al. 1994. Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 55(1):27–33.
- Batista, O., C.J. Kolman, E. Bermingham. 1995. Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panama. *Hum. Mol. Genet.* 4(5):921–929.
- Block, D. 1980. In search of El Dorado: Spanish entry into Moxos, A Tropical Frontier, 1550–1767. Ph.D. diss., The University of Texas, Austin, TX.
- Bonato, S. L., and F.M. Salzano. 1997. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(5):1866–1871.
- Bonato, S.L., and F.M. Salzano. 1997. Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the New World. *Am. J. Hum. Genet.* 61:1413–1423.
- Cavalli-Sforza, L.L., and A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Evolution* 32:550–570.
- Denevan, W. 1966. *The Aboriginal Cultural Geography of the Llanos de Mojos of Bolivia*. Berkeley: University of California Press.
- Diez Astete, A., and Riester J. 1996. Etnias y territorios indígenas. In *Comunidades, territorios indígenas y biodiversidad en Bolivia*. CIMAR Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Santa Cruz, Bolivia: Miothek K. Eds.
- Excoffier, L., P.E. Smouse, and J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 1992:479–491.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: Phylogeny inference package. Version 3.2. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.
- Horai, S., R. Kondo, H.Y. Nakagawa et al. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10(1):23–47.
- Kolman, C.J., and E. Bermingham. 1997. Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Choco and Chibcha Amerinds of Panama. *Genetics* 147(3):1289–1302.
- Lorenz, J.G., and D.G. Smith. 1996. Distribution of four founding mtDNA haplogroups among Native North Americans. *Am. J. Phys. Anthropol.* 101(3):307–323.
- Merriwether, D.A., and R.E. Ferrell. 1996. The four founding lineage hypothesis for the New World: A critical reevaluation. *Mol. Phylogenet. and Evol.* 5(1):241–243.
- Merriwether, D.A., R.E. Ferrell, and F. Rothhammer. 1995a. mtDNA D-loop 6-bp deletion found in the Chilean Aymara: Not a unique marker for Chibcha-speaking Amerindians [letter]. *Am. J. Hum. Genet.* 56(3):812–813.
- Merriwether, D.A., F. Rothhammer, and R.E. Ferrell. 1995b. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98(4):411–430.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106:283–292.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Reynolds, J.B., B.S. Weir, C.C. Cockerham. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105:767–779.

- Ruhlen, M. 1991. *A Guide to the World's Languages*. Stanford, CA: Stanford University Press.
- Saignes, T. 1985. *Caciques, tribute and migration in the Southern Andes. Indian society at the 17th. century colonial order (Audiencia de Charcas)*. London University: Institute of Latin American Studies.
- Santos, M., R.H. Ward, and R. Barrantes. 1994. MtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Hum. Biol.* 66(6):963–977.
- Schurr, T.G., S.W. Ballinger, Y.Y. Gan et al. 1990. Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies suggesting they derived for four primary maternal lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 46:613–623.
- Torroni, A., J.V. Neel, R. Barrantes et al. 1994. Mitochondrial DNA “clock” for the Amerinds and its implications for timing entry into North America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1158–1162.
- Torroni, A., T.G. Schurr, M.F. Cabell et al. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.* 53:563–590.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4):506–513.
- Ward, R.H., F.M. Salzano, S.L. Bonatto et al. 1996. Mitochondrial DNA polymorphism in three Brazilian Indian tribes. *Am. J. Hum. Biol.* 8(3):317–323.
- Weir, B.S. 1990. *Intraspecific Differentiation*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Wrischnik, L.A., M. Higuchi, M. Stoneking et. al. 1987. Length mutations in human mitochondrial DNA: Direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Nucleic Acids Res.* 529–542.

3.5

ANNALS OF HUMAN BIOLOGY
JANUARY–FEBRUARY 2004, VOL. 31, NO. 1, 9–28



**Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos:
Moxo, Movima and Yuracare Amerindian populations
from Bolivia lowlands**

F. BERT†, A. CORELLA†, M. GENÉ‡, A. PÉREZ-PÉREZ† and D. TURBÓN†

† Secció Antropologia, Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

‡ Departament de Medicina Legal, Laboratori de Genètica Forense, Facultat de
Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 12 March 2003; in revised form 25 July 2003; accepted 1 August 2003

Las poblaciones Movima, Yuracaré, Ignaciana y Trinitaria son poblaciones Amerindias que viven en las tierras bajas de Bolivia también llamadas Llanos de Moxos.

La afinidad cultural y genética de dichas poblaciones es bastante desconocida y toda la información hasta el momento es parcial y atiende básicamente a aspectos más bien culturales y lingüísticos. La región había estado densamente poblada en tiempos precolombinos como demuestran la multitud de vestigios arqueológicos hallados en la zona.

El objetivo del estudio es caracterizar genéticamente las poblaciones anteriormente citadas analizando la variabilidad de la región de control HVR-I del ADNmt. El origen Amerindio de las poblaciones estudiadas sugiere un alto grado de similitud genética entre las poblaciones estudiadas y otras más alejadas, sin embargo procesos complejos de interacción y aislamiento en las poblaciones del Beni pueden ayudar a entender la dinámica poblacional y la historia evolutiva de otras micro-regiones parecidas del continente.

El ADN se extrajo a partir de muestras de bulbos capilares extraídas “*in situ*”. Se estudiaron un total de 54 muestras de individuos no emparentados. Las muestras fueron guardadas en tubos eppendorfs estériles hasta el laboratorio, donde se procedió a su análisis. Todas las muestras fueron recogidas utilizando los estándares éticos del comité responsable en experimentación humana y con la Declaración de Helsinki de 1975 y revisada en 1983. Todos los individuos dieron su consentimiento para la obtención de muestras.

La extracción de ADN se realizó utilizando ChelexTM 100 tal y como describe Walsh et al. (1991). Se analizó un fragmento de 401 pares de bases de la región de control del segmento I (HVSI) del ADN mitocondrial desde la posición 16,000 a la 16,400.

Se secuenciaron independientemente dos fragmentos de ADN mitocondrial, uno de 401 pares de bases y otro más corto de 328 pares de bases utilizado para la comparación filogenética con otras poblaciones sudamericanas. El análisis incluyó “*mismatch distribution*”, “*mean pairwise difference*”, “*median networks*” y comparaciones filogenéticas “*neighbour joining*”. La diversidad genética de las secuencias de ADN se calculó por varios métodos y se representó utilizando árboles UPGMA.

La región hipervariable del ADNmt de 54 muestras mostró un total de 34 linajes distintos definidos por 41 posiciones nucleotídicas variables, el 70,6 % de los linajes fueron secuencias únicas. Se encontraron los 4 haplogrupos característicos de las poblaciones Amerindias, 18,5% A, 24,1 B, 50,0% C y 5,6% D.

Se hallaron unos niveles altos de variabilidad molecular y utilizando los *median networks* se dedujo que el Beni pudo actuar como un núcleo geográfico de expansión poblacional, tal y como los datos históricos apuntan.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la varianza es debida a la variabilidad intrapoblacional y que los valores más altos de varianza se hallaban cuando se realizaban *clusters* basados con criterios de afinidad lingüística.

Los árboles filogenéticos presentaban linajes exclusivos vinculados a las poblaciones del Beni.

Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracare Amerindian populations from Bolivia lowlands

F. BERT†, A. CORELLA†, M. GENÉ‡, A. PÉREZ-PÉREZ† and D. TURBÓN†

† Secció Antropologia, Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

‡ Departament de Medicina Legal, Laboratori de Genètica Forense, Facultat de
Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 12 March 2003; in revised form 25 July 2003; accepted 1 August 2003

Summary. *Background:* Movima, Yuracare, Ignaciano and Trinitario are Amerindian populations living in the Bolivian lowlands of the Amazonian basin. The cultural and genetic affinity of the peoples living in this area is poorly known, despite many archaeological studies demonstrating its importance in pre-Columbian times. Densely populated Amerindian groups occupied the region, both in the Llanos and along the river streams of the Amazonian basin, practising intense agricultural activities and exchange of goods. The historical and linguistic records indicate that the land was occupied through successive migrations that gave rise to complex socio-economic communities. Genetic information suggests that the colonization of the American continent was fairly simple from an emigrational point of view, but other evolutionary processes, such as genetic drift or natural selection, could have also shaped the genetic background of present day populations in the Beni region.

Aim: The objective of this study is to characterize the genetic diversity of these populations by analysing the sequence variability of the HVR-I control region in the mitochondrial DNA (mtDNA). The Amerindian origin of these populations suggests that close genetic similarities should be evident between the Beni samples studied here and other Amerindian groups. However, complex processes of population interactions and/or isolation in the Beni region might result in non-expected genetic affinities.

Subjects and methods: DNA was extracted from pulled-out hairs obtained *in situ* from non-closely related individuals living in the Beni Department in Bolivia. DNA was extracted using a standard Chelex™ 100 method and a 401 bp DNA fragment of the HVR-I region was amplified using specific primers (L-15978 and H-16412). DNA amplicons were purified by centrifugation using Microspin™ S-300 HR columns and both SNA strands were sequenced after asymmetric PCR using direct Dye-Terminator 2 sequencing kit (Perkin-Elmer). Two independent 401 and 328 bp DNA fragments were sequenced separately for each sample. The sequence analyses includes mismatch distributions and mean pairwise differences, median network analysis, and neighbour joining, maximum likelihood phylogenetic comparisons. Genetic diversity of DNA sequences was also measured in various ways for the sample studied and UPGMA trees were drawn, including a large number of South Amerindian sequences.

Results: The genetic diversity of 401 nucleotide long mtDNA sequences in the hypervariable control region, from positions 16000–16400, was characterized in a sample of 54 Amerindians living in the Llanos de Moxos. A total of 34 distinct lineages were observed, defined by 41 variable nucleotide positions, and 70.6% of all lineages were single sequences. All four major Amerindian haplogroups were detected (A 18.5%, $n = 10$; B 24.1%, $n = 13$; C 50.0% $n = 27$; and D 5.6%, $n = 3$). The median network analysis observed suggests that processes of population expansion took place in the Beni region. However, no clear haplotype differentiation by population could be detected. High levels of molecular variability and a bimodal pair-wise mismatch distribution were seen within the sample. The analyses of molecular variance (AMOVA) showed that most of the variance observed was due to intrapopulation variability, and that the highest among-groups variance was obtained when a linguistic classification criteria was used. The phylogenetic comparison revealed unique lineages in the Beni areas, not reported for other Amerindian populations.

Conclusions: The genetic diversity observed in the Beni area is higher than that observed in other American populations living in much larger areas and with a long, known evolutionary history, despite the reduced area of Moxos. This could result from processes of reproductive isolation between groups, followed by population expansions and migration, where genetic drift might have been a major evolutionary force in population differentiation.

1. Introduction

The term 'Moxo' first appeared in an early Spanish document of the sixteenth century, probably translated from an Inca word, referring to the inhabitants of the tropical lands to the East of the Peru province. The thought of a reach territory full of splendour and richness quickly spread among the Spanish conquerors spiked by the magnificent reports of native informants. The territory of 'Gran Moxos' was then added into the 'Golden search' (Block 1980). From a geographical point of view, this area extended throughout the vast tropical plains that today comprise the Bolivian Beni Department (figure 1). Its 180 000 km² occupy the central area of the Beni river basin, between the Guaporé and Madre de Dios rivers. Altitude in the Llanos de Moxos ranges from 170 to 275 m near the Brazilian frontier. This flat outline produces a savanna landscape with a great number of rivers and effluents with ever-changing courses. Climate is characterized by the alternation of dry and rainy seasons. During the rainy period, the rivers deluge the land and alter the landscape, its ecological dynamics, and the distribution of resources, thus greatly affecting human occupation and adaptation.

There is no written documentation on the human occupation of Llanos de Moxos before the arrival of Spaniards in 1580, and even then their initial incursions to Moxos were sporadic. As Spaniards progressively penetrated the forest and savannas, the

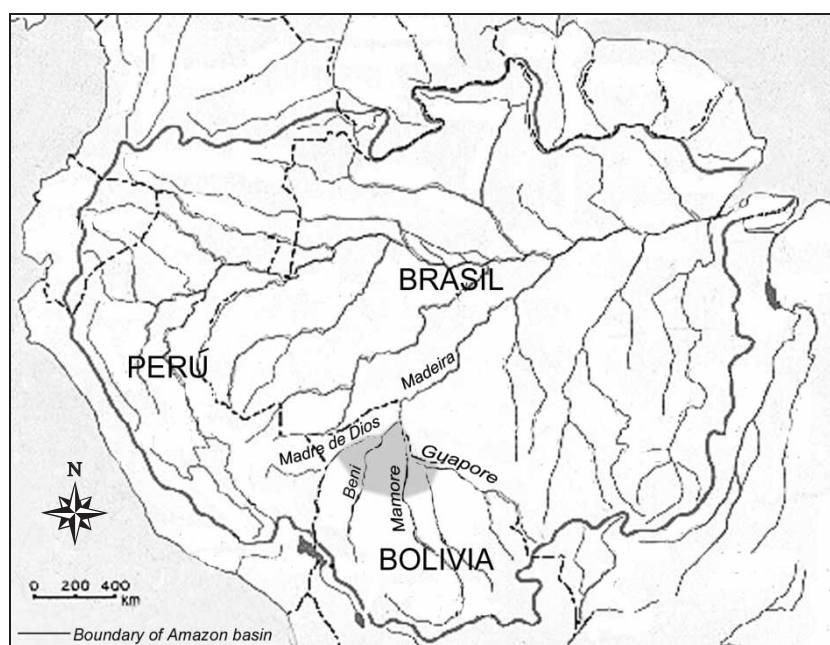


Figure 1. Geographic location of the Llanos de Moxos area in the Amazonian basin.

knowledge of the inhabitants of this area increased. However, it was not until the arrival of Jesuit missionaries in the late seventeenth century that the historical record began to draw a vague picture. Their testimony, although certainly partial, is one of the most relevant in the Amazonian area. Jesuit sources reported that several tribes peopled the Moxos. The Moxo and Baure (both Arawakan speakers) were considered the more adapted and numbered groups. In 1696, father Eguiluz counted 19 760 Arawakan-speaking people living in Jesuit Reductions, along with 70 000 other Indians. He described more than 15 ethnic groups in a small area, all speaking distinct languages (Gantier 1991).

There is great controversy regarding the number of inhabitants upon the first European contact. Moderate estimations suggest a native population size of 200 000 inhabitants, 50 000 of whom would be Moxo Indians. Denevan (1966) estimated a population size of 350 000 people after the first century of contact, with a population density of 2 inhabitants per km², which may represent the lowest population density in America (Steward 1949). Denevan (1966) pointed out that the size and distribution of the Amazonian populations were variable and dispersed owing to specific habitat traits. Harsh ecological conditions greatly conditioned the economical and cultural subsistence strategies of the prehispanic Amazonian populations. The most advanced societies of the Amazonian basin concentrated in the Brazilian coast, in the varzea of the great Amazonian rivers and in the Beni savannas of Bolivia, while less intensive farmers lived in upper rivers or minor streams, and semi-nomadic hunter-gatherers lived in the forests. The diversity of languages found in the riverheads of many South American rivers suggests that human occupation and migration tended to move towards the highlands when more structured tribes occupied the lowlands.

Despite the archaeological studies of Denevan (1966) and, more recently, Erikson (1999), the Beni area remains poorly known. The early tribes living in the Llanos de Moxos showed great experience in soil use, fishing techniques and river transportation, similar to that described for the Titicaca Lake, where the Uru, Quechua and Aymara cultures spread (Erikson 1999). In both cases, the landscape was shaped and transformed by intense agricultural activity. Saignes (1985) suggested a cultural continuum from the Puquina group, that lived around Titicaca Lake, to some Tacana and Moxo groups, around the Beni and Mamoré rivers, based on the exchange of goods, such as metals, coca, wood, wax, honey and exotic birds. The historical records clearly show that the first South American settlers eventually occupied all ecological niches, from the Andean mountains to the tropical forests, but little is known of the process and timing of settlement. The relevance of the high-altitude Andean plateau as a north-south corridor seems clear, but the routes across the tropical forest (Lynch 1983) are controversial. Moraga *et al.* (2001) point out the link between the prehistoric groups of the Azapa valley in the north of Chile with Andean and Amazonian populations, suggesting an Amazonian origin for the Andean groups. Rothhammer *et al.* (2001), in a genetic comparison between Andean and Amazonian populations, suggested two migrations in South America, one from the central and south Andean areas to the east of Brazil and the Argentine pampas, and another eastwards to Venezuela and Guyana, arriving to the Brazilian Amazon and the eastern slopes of the Andes through waterways of the Amazonian river tributaries some 3500 years ago. Rothhammer *et al.* (2001) also believe that present-day Andean natives are descendants of those Amazonian groups. However, Dixon (2001) suggested that the coastal Pacific was the main path in the colonization

of the continent, with inland movements and settlements. Coastal migrations may be faster, whereas eastward migrations from the coast to the interior of the continent may be much slower.

Linguistic studies seem to indicate that Moxos was populated through a series of migrations. Arawak speakers might have arrived in Moxos in several waves. Noble (1965) proposed a proto-arawakan migration by 3000–1500 BC from the headwaters of Ucayali and Madre de Dios (in modern Peru), followed by a second wave of Maipuran–Arawakan speaking groups. Lathrap (1970) also considered various waves of Arawakan speakers, but placed their origin in the central Amazon, going upstream north and south towards the Andes, displacing other groups that occupying the lands in their migration routes. These linguistic analyses are in general accordance with the scenario reported by the initial European accounts of Moxos, describing a complex linguistic configuration in which only two of the major groups spoke Arawak languages (Block 1980). However, this linguistic model is far from a satisfactory explanation for the peopling of this area.

Historical records, linguistic analyses and genetic studies are all informative sources on the processes of modern human dispersal. America has always been considered a relatively simple example of human dispersal because of its unique entry pathway through Beringia and its recent dispersal events. However, all the analyses tend to depict a highly complex morphological, linguistic and genetic picture. Although the overall process of occupation of America is fairly well known, the local diversification and population interactions are not completely understood. The present paper provides new data on the genetic variability of the lowland Beni populations that may contribute to understand the process of human dispersal in the lowlands of the Amazonian region.

1.1. Populations

When Jesuits arrived to Moxos by the end of the seventeenth century they sorted the native populations of the savanna into distinct hierarchies based on the resources controlled by each group at the moment of contact and their degree of cooperation with the missionary schema (Block 1980). Moxo indians were considered one of the most advanced tribes, with a well-developed agriculture, control of the major river systems, a complex social structure, and large populations. The Movima occupied a second rank in this hierarchy, they inhabited minor rivers and open savannas, and practised a less sophisticated agriculture. The Yuracare were an even less structured group, with no agricultural practices and a hunter–gatherer way of life.

1.1.1. Moxo (Ignaciano and Trinitario). ‘Moxo’ was the collective designation for a specific group of populations living in the forests and prairies of the upper Mamoré river, between Guaporé and Beni rivers, and speaking languages and dialects belonging to the widespread Arawak stock, as it is recorded in the Mission Annals of South America, from Jesuit sources. Their social structure and political organization, with chiefs and division of labour, is in accordance with the hypothesis of a dense population structure that constructed artificial hills and elevated ways, and used complex techniques in agriculture to survive in a hard geological and climatic environment. The earlier attempts to missionize the Moxos were unsuccessful. In 1686, Father Cipriano Barace founded the first Mission, Loreto, followed by Trinidad in 1687. Father Antonio de Orellana founded San Ignacio in 1689 and other Jesuits founded

Table 1. Census of the San Ignacio de Moxos Mission made in 1754 by an anonymous author showing the name of each ethnic group (partiality) and their language (Block 1980).

Ethnic group	Language name	Language filiation
Punuana	Moxo	Moxo
Casabeono	Moxo	Moxo
Ovoropono	Moxo	Moxo
Ursiono	Moxo	Moxo
Tauribocono	Moxo	Moxo
Camamana	Moxo	Moxo
Parabocono	Parabocono	Moxo dialect
Caritsiriono	Parabocono	Moxo dialect
Arrebocono	Arrebocono	Moxo dialect
Monuveono	Arrebocono	Moxo dialect
Cayupina	Docuicuna	Moxo dialect
Moabocono	Docuicuna	Moxo dialect
Furiabocono	Furiabocono	another language
Chusebocono	Chusebocono	different of all them
Comovokono	?	?
Churimana	Movima	Movima

San Xavier in 1690, San José in 1691 and San Borja in 1693. These six Missions soon grouped close to 20 000 Indians. In 1736, the number of Missions rose to about 20, and the number of ‘converts’ increased to almost 50 000. In 1797, 30 years after the expulsion of the Jesuits, this figure decreased to 20 345 ‘souls’ in 11 Missions. The Jesuits referred to each ethnic group within a Mission as ‘parcialidad’ (partiality). Some strategies were used to join these ‘partialities’ (Barnadas 1985), but the main one was the use of a unique language, spoken by the most numerous group or the first group contacted. The census of Indians joining the missions reflected the ethnic composition of each Mission (table 1). The San Ignacio and Trinidad Missions are now occupied by the villages of San Ignacio and Trinidad, around which the settlements of Ignaciano and Trinitario Indians are located. The estimated size of these populations is around 4000 Ignaciano and 5000 Trinitario. Both groups still speak their own, though closely related, languages. If other Moxo Indians living in the area are considered, the whole population size of Moxo Indians is around 30 000 (Block 1980).

1.1.2. Movima. The history of this group is poorly known. Its presence in the Llanos de Moxos is reported in Spanish documents, but few data are available. They were ‘reduced’ by Jesuit missionaries between the end of the seventeenth and the beginning of the eighteenth centuries, but remained unmixed to a certain extent and their languages were spoken in their respective ‘reductions’: Movima in Santa Ana de Yacuma in 1698; Cayubaba in Exaltación in 1705 and Itonama in Magdalena in 1717. Between 1674 and 1700, the estimated number of Movima inhabitants was 20 000, distributed in 80 villages (Block 1980), and around 6000 Movima Indians live today in several communities surrounding the city of Santa Ana, in the province of Yacuma in the Beni Department. They tend to concentrated near the Beni river, where occasional hills afford relief from the annual deluge. Probably not more than 1000 still speak the Movima language, an unclassified language belonging to the Equatorial-Tucanoan subgroup of the Amerindian stock (Ruhlen 1991).

1.1.3. Yuracare. The Yuracare are mentioned in the early Jesuit accounts of Moxos in 1674, but despite some sporadic attempts, they were never 'reduced'. The Jesuits were not especially interested in bringing this group into the 'reduction' system, probably because of their small population size, differences in their cultural system and way of life. After the Jesuit expulsion, Franciscan priests founded some Yuracare missions at the end of the eighteenth century, but with poor success because the Yuracare did not adapt to the sedentary model of the 'mission'. The original Yuracare geographical distribution is not clear. Nowadays they live between the headwaters of the rivers Secure and Ichilo, near the Andean foothills, but this area may be the result of defensive migrations. They display greater adaptive responses to forested environments than the Moxo and Movima, and their way of life remains nomadic. They speak an unclassified and isolated language belonging to the Equatorial-Tucanoan stock (Ruhlen 1991), and their population size has been estimated in about 3000 people.

2. Methods

Samples for genetic analyses consisted of pulled-out hairs with preserved roots. They were collected in several settlements in the Beni Department and stored in sterile tubes until analysed in the laboratory. Strong selection criteria were applied before collecting a sample. Family relationships and ethnicity were determined *in situ* by a demographic survey simultaneous to the sampling. Ethnicity was assigned to individuals based on self-identification during an interview about their name, birthplace, language and family affiliation. Only unrelated and unmixed individuals were studied.

DNA was extracted using ChelexTM 100, as described by Walsh *et al.* (1991). A 401 bp DNA fragment from the Control Region of the Hypervariable Region I of the mitochondrial DNA (mtDNA, HVR-I) molecule was analysed, from np 16000 to np 16400. The double-stranded DNA fragments were amplified by PCR using primers L-15978 (5'-CTACGCCAATCACTTTATTG-3') and H-16412 (5'-GTGCGGGATATTGATTTTAC-3'), following a PCR protocol consisting of 34 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 54°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. After purification of PCR products with MicrospinTM S-300 HR columns (Pharmacia, Biotech), both DNA strands were sequenced separately in an asymmetric PCR, using primers L-15978 (5'-CTACGCCAATCACTTTATTG-3') and H-16402 (5'-TGATTTTACGGAGGATGGT-3'), following the standard protocol recommended for automatic direct sequencing by the kit manufacturer (Dye-Terminator 2, Perkin-Elmer). The sequencing PCR protocol consisted of 34 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 60°C for 30 s. PCR purification was performed by salt/ethanol precipitation and the final product was run in an automatic ABI PRISM 3700 sequencer at the 'Serveis Científic-Tècnics' of the University of Barcelona.

Two sets of sequence analyses were performed for each population: one using the whole 401 bp mtDNA fragment obtained, and the other with a shorter fragment of 328 bp, coincident with that mostly described in the literature, for comparison with other South Amerindian populations. In the 401 bp set (bp 16000 to bp 16400), sequences were aligned and compared with the Cambridge Reference Sequence (Anderson *et al.* 1981) using the CLUSTAL V software (Higgins *et al.* 1992). The sequences had been previously assigned to the major Amerindian haplogroups

by restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Bert *et al.* 2001). Mismatch distributions and the mean pairwise sequence differences were calculated using the ARLEQUIN 2000 package (Schneider *et al.* 2000) for each population. The phylogenetic relationships among sequences were determined by a Median Network analysis using NETWORK 3.0.1.2 alpha version (Bandelt *et al.* 1999). The phylogeny of these lineages was also inferred from Neighbour Joining and Maximum Likelihood phylogenetic analyses using PHYLIP 3.6 software (Felsenstein 1993). Analyses of Molecular Variance (AMOVA) were performed using the ARLEQUIN 2000 package (Schneider *et al.* 2000) at various hierarchical levels, and under a linguistic criterion of classification, to search for significant interpopulation variance between the sets of populations obtained under these criteria. In the second set of analyses, the shorter 328 bp fragment (bp 16 056 to bp 16 383) was compared with other mtDNA sequences of Native Americans (Handt *et al.* 1998, HVR-Base Version 1.0 alpha release). Several molecular diversity indexes were calculated using the ARLEQUIN 2000 package (Schneider *et al.* 2000). Gene diversity was estimated using Nei's (1987) index and long-term genetic diversity was estimated as

$$E(v) = \frac{K}{0.577 + \ln(n - 1)}$$

where K is the number of polymorphic sites, and n is the sample size. This seems to be a reliable estimator of the evolutionary history of a population, because $E(v)$ is independent of haplotype frequencies, and measures a long-term average value rather than a single-generation value (Excoffier and Langaney 1989). To test the neutral mutation hypothesis, which considers the populations to be panmictic and in genetic equilibrium, Tajima's D statistic was calculated (Tajima 1989) for each population separately. UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) trees were built for all populations and haplogroups using the MEGA version 2.1 (Kumar *et al.* 2001).

3. Results

3.1. Control region sequence variation

Table 2 shows the 54 sequences obtained, showing their ethnic affiliation and sorted by haplogroup. They sequences belong to 34 distinct lineages, defined by 41 variable nucleotide positions. It was found that 70.6% of these lineages were represented by single sequences. Ten individuals (18.5%) belonged to haplogroup A (showing the transitions 16 111 C → T, 16 223 T → C, 16 290 C → T, 16 319 A → G and 16 362 T → C, except individual Yur-311. Thirteen sequences (24.1%) belonged to haplogroup B (all of them showing the 16 189 T → C transition and most bearing the 16 217 T → C transition). Twenty-seven samples (50.0%) belonged to haplogroup C (exhibiting transitions 16 223 C → T, 16 298 T → C, 16 325 T → C and 16 327 C → T). The 16 325 T → C transition has also been described in Argentinean Mapuche (Ginther *et al.* 1993) and in some Amazonian samples (Santos *et al.* 1996). Three sequences (5.6%) were included in the D haplogroup. Sample Tri-361, showing transition 16 290 C → T, could not be grouped with any known haplogroup.

3.2. Median networks

Figure 2 shows the phylogenetic relationships between the mtDNA lineages obtained with a median-network portrait. The lineages, labelled in table 2, appear clearly clustered by haplogroups. The median network shows three main

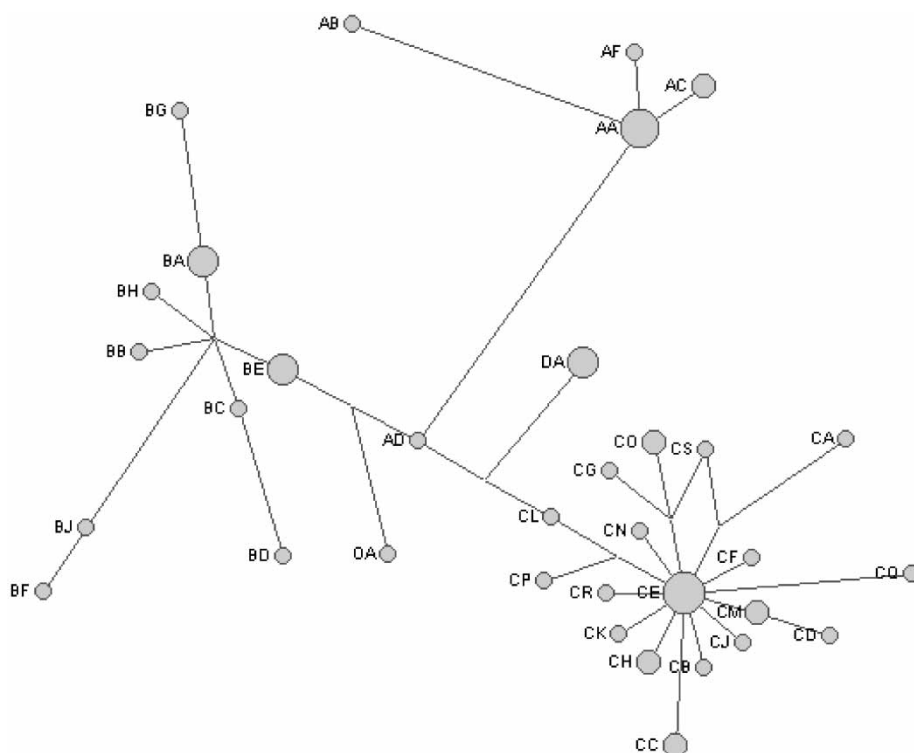


Figure 2. Median-joining network plot showing the genetic relationships between the lineages reported in this study.

diversification centres. Lineage C_E , which includes five Movima, one Trinitario and one Ignaciano, is the centre of a star-shaped group, from which new lineages derive by single mutations. This type of lineage configuration is indicative of population expansion (Forster *et al.* 1996). No clear haplotype differentiation by population was detected, since identical haplotypes are shared by more than one population, as also reported for Ngobe (Kolman *et al.* 1995), Kuna (Batista *et al.* 1995), Haida (Torrioni *et al.* 1993), Nuu-Chah-Nulth (Ward *et al.* 1991) and Mapuche (Ginther *et al.* 1993).

The analysis of the polymorphic sites in the network evidences a high degree of molecular variability within the sample. Polymorphism at np 16217 appears three times in the network and five times at np 16189, and both may have occurred independently several times in separate lineages, including haplogroups devoid of the Asian 9 bp deletion (Horai and Hayasaka 1990). All A, C and D lineages carry a C \rightarrow T transition at np 16223, and haplogroup C shows genetic homoplasies generated by independent mutations at 16192 and 16287. The absence of mutations at sites 16298 and 16327, and the T \rightarrow C transitions at 16189 and 16362 characterize lineage D, which includes two Movima samples and one Ignaciano. Sample Yur-311, previously typed as belonging to haplogroup A by RFLP (Bert *et al.* 2001), is at the beginning of the diversification branch of its haplogroup, and shows transitions at bp 16223 C \rightarrow T and 16189 T \rightarrow C. The other lineages of the same haplogroup show the transitions C \rightarrow T at 16111 and 16290, T \rightarrow C at 16319 and 16362, and loss of the 16189 T \rightarrow C. In the network, haplogroup A spreads from a centre formed by two Ignaciano, two Yuracare and one Trinitario lineages.

The B haplotypes show loss of the transition at bp 16 223 and a transition gain at bp 16 217. The B_E lineage is formed by one Ignaciano, one Yuracare and one Movima lineages. This branch is also radial-shaped but lacks a main central lineage. The great length of its branches suggests a longer time of expansion than for haplogroup C. Haplotype diversity values were not used to calculate coalescence times because of the controversy regarding the evolutionary model for the mtDNA control region (Schneider and Excoffier 1999), the uncertainties about the average mutation rate (Parson *et al.* 1997) and the discrepancies in the timing of population movements in lowlands and highlands of South America.

3.3. Pairwise differences distribution

Pairwise mismatch distributions were calculated for the whole sample from Llanos de Moxos, as well as for each population considered (Ignaciano, Trinitario, Movima and Yuracare). The mismatch distribution (figure 3) of the whole sample shows a clear bimodal pattern, with a main peak at nine differences

Ann Hum Biol Downloaded from informahealthcare.com by Joaquin Ibanez Esteb on 12/07/10
For personal use only.

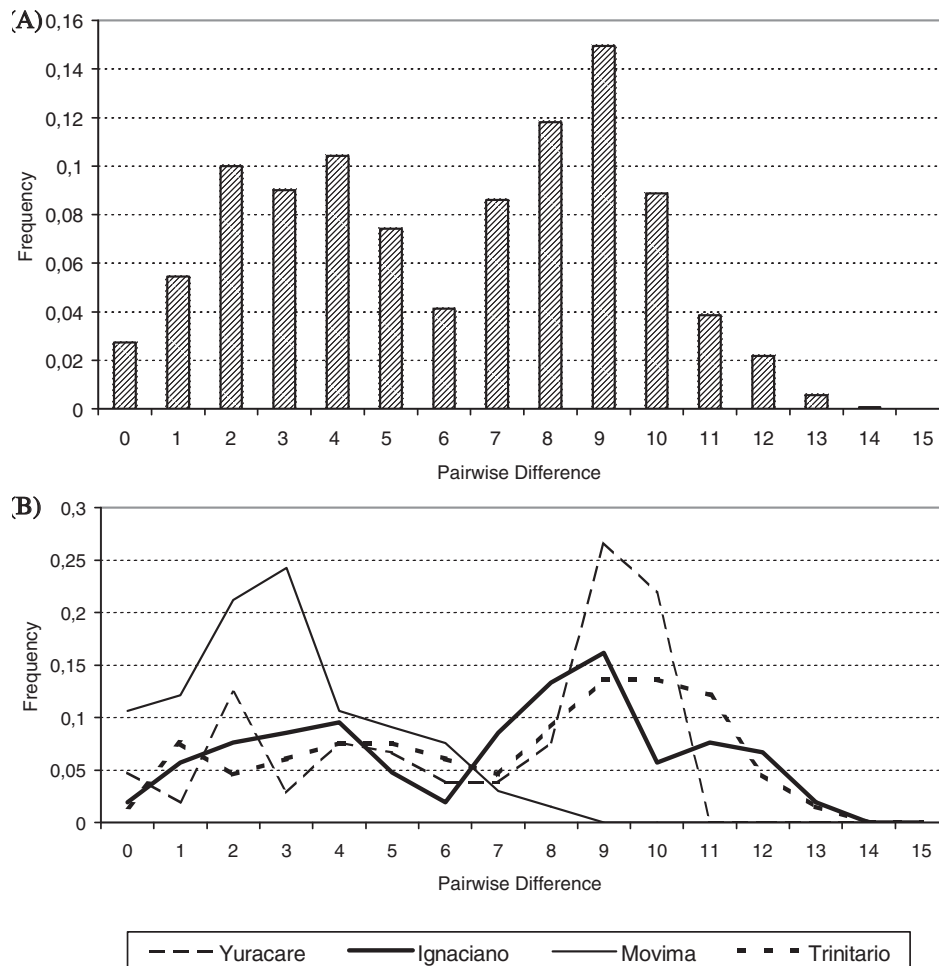


Figure 3. Pairwise mismatch distributions (a) for all the populations studied, (b) for each population, and (c) for haplogroups A, B and C with all the populations.

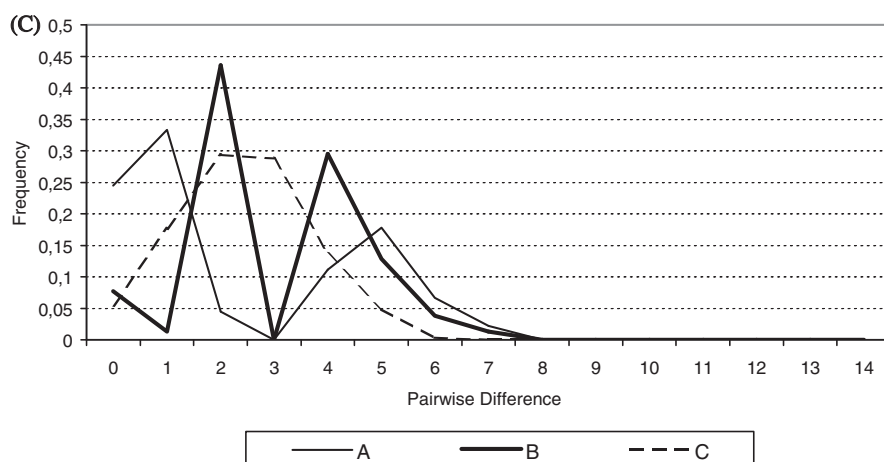


Figure 3. Continued.

and a smaller one between two and four differences. The average number of pairwise differences is 6.10 ± 2.95 . The Yuracare also show a bimodal distribution, with a major peak at nine differences and a lower one at two differences, the average number of pairwise differences being 6.68 ± 3.34 . The mismatch distribution of both Arawak-speaking populations, Ignaciano and Trinitario, are very similar, showing a clear peak at nine differences and a smaller one around two to four differences, which corresponds to their common ethnic affiliation. The Trinitario pairwise distribution shows an additional peak at one difference, with an average number of pairwise differences of 7.10 ± 3.58 , and the Ignaciano population has an average value of 6.78 ± 3.38 . If both groups are considered together, the mean pairwise difference is 6.78 ± 3.30 and the mismatch distribution shows the same profile. The Movima population has a clear unimodal distribution, with a peak at three differences and a mean number of pairwise differences of 2.94 ± 1.65 , clearly lower than that of the other populations studied. The mismatch distribution of the Moxo Arawakan-speaking populations (Trinitario and Ignaciano) is identical to that of the whole Llanos de Moxos sample, which may point to the influence of the Moxo Indians in this geographic context. The mismatch distribution analysis was also carried out for each haplogroup, except for haplogroup D given its small sample size. The distribution of the pairwise differences is bimodal for haplogroups A and B. Haplogroup A shows peaks at one and five differences, with an average number of pairwise differences of 2.31 ± 1.3 , and haplogroup B shows peaks at two and four differences, with a mean pairwise difference of 3.02 ± 1.68 . The distribution of haplogroup C is unimodal, with a peak at two differences and a mean pairwise difference value of 2.43 ± 1.36 .

3.4. Analysis of molecular variance

The AMOVA test measures the percent of the total variance observed in the distribution of the populations that can be attributed to (1) the within-population variance, (2) the among-groups population variance and (3) the among-population within-group variance (Excoffier *et al.* 1992). The test was performed at several hierarchical levels in the studied sample: (1) the whole sample as a single population, (2) using linguistic criteria for classifying groups, and (3) comparing pairs of

populations to determine whether interpopulation variance was significant and whether the groups were genetically distinguishable. Most of the variance observed was due to intrapopulation variability within the sample (table 3). At the first level, considering all the groups together, the AMOVA shows very significant intrapopulation variability with 97.4% of the total variance being caused by within-population differences. Similar results were obtained in a previous AMOVA RFLPs study (Bert *et al.* 2001), in which the Movima were found to be responsible for most of the variance observed. At the inter-population level, the high values of among-groups molecular variance, combined with low values of among-populations within-group variance, points to the reliability of the clustering criteria and the genetic proximity of these populations. The highest among-groups variance values were obtained when linguistic criteria were used, by comparing the Equatorial-speaking populations (Ignaciano, Trinitario and Yuracare) versus the Tucanoan-speaking group (Movima), which indicates the relevance of language diversification in the configuration of the Llanos de Moxos population. Similar results are obtained if further linguistic distinctions are made by comparing the Equatorial Arawakan-speaking populations (Ignaciano and Trinitario), the isolated Equatorial-speaking Yuracare, and the Tucanoan-speaking Movima.

3.5. Sequence diversity analysis

Sequence diversity values for all the samples are shown in table 4, considering only the short 328 bp fragment (np from 16 056 to 16 383) for comparison with other Amerindian populations (Ginther *et al.* 1993, Santos *et al.* 1994, Kolman *et al.* 1995, Batista *et al.* 1995, Ward *et al.* 1996). The diversity values (h) obtained are very similar in all the populations considered except for the Movima, which shows the lowest value of nucleotide diversity ($\pi=0.009$). This is one of the lowest figures

Table 3. AMOVA values for the Llanos de Moxos population.

	AMOVA values (%)		
	a	b	c
One group with all populations	2.6		97.4
Equatorial group/Tucanoan group	7.1	-0.7	93.7
Ignaciano-Trinitario/Yuracare/Movima	6.9	-3.2	96.2

Variance components: a = among groups; b = among populations within groups; c = within populations.

Table 4. Sequence diversity parameters for the populations reported in this study.

Population	N	n	k	% single lineages	$h \pm SD$	$\pi \pm SD$	$E(\nu)$	Tajima's $D(p)$
Yuracare	15	11	22	72.7	0.9524 \pm 0.0403	0.0204 \pm 0.0114	6.84	-0.049 (0.495)
Movima	12	8	12	75.0	0.8939 \pm 0.0777	0.0090 \pm 0.0056	4.03	-1.093 (0.151)
Moxo*	27	20	31	85.0	0.9772 \pm 0.0171	0.0196 \pm 0.0106	8.08	-0.736 (0.248)
Ignaciano	15	11	23	81.8	0.9619 \pm 0.0399	0.0195 \pm 0.0109	7.15	-0.394 (0.370)
Trinitario	12	11	22	90.9	0.9848 \pm 0.0403	0.0207 \pm 0.0118	7.39	-0.292 (0.409)
Total	54	32	39	71.9	0.9588 \pm 0.0156	0.0180 \pm 0.0097	8.57	-1.035 (0.157)

N , number of individuals; n , number of different lineages; k , number of polymorphic sites; h , gene diversity; π , nucleotide diversity; $E(\nu)$, long-term nucleotide diversity.

* Values obtained for the whole Moxo Indian populations studied (Ignaciano and Trinitario joined).

found in the New World, similar to the values found in the Huetar (0.011), the Xavante (0.009) and the Kuna (0.01). The highest values of nucleotide diversity observed were 0.0207 for the Trinitario and 0.0204 for the Yuracare. These are among the highest values obtained in the Amerindian populations, similar to that reported for the Mapuche ($\pi=0.018$). The highest long-term nucleotide diversity observed was found in the Moxo population, $E(\nu)=8.08$, and the lowest in the Movima group, $E(\nu)=4.03$.

3.6. Phylogenetic analyses

To compare the Llanos de Moxos sequences with a representative South Amerindian sample, an UPGMA tree was generated with the 328 bp DNA fragment. Three hundred and fifty-two sequences, including the samples studied here, were analysed. These include the Pima, $n=41$ (Kittles *et al.* 1999), Mapuche, $n=39$ (Ginther *et al.* 1993), the Zoro, $n=29$, Gaviao, $n=28$, and Xavante, $n=25$ (Ward *et al.* 1996), the Ngobe, $n=46$ (Kolman *et al.* 1995), the Kuna, $n=63$ (Batista *et al.* 1995) and the Huetar, $n=27$ (Santos *et al.* 1994). The resulting UPGMA tree (figure 4)



Figure 4. UPGMA tree showing the locations of the sequences reported in this study within a sample of South Amerindian sequences available in the literature.

shows that the Beni populations include, in the one hand, sequences that are also present in other groups of the continent and, on the other hand, unique sequences exclusive of the Beni area, either in the Ignaciano, Trinitario, Movima or Yuracare populations.

4. Discussion

The genetic analysis of the autochthonous populations inhabiting the lowlands of the Beni Department in Bolivia shows that they constitute one of the most diverse human groups in the whole American continent. Their levels of mtDNA diversity are even higher than those found in the most variable Amerindian groups, especially considering that they occupy a much smaller region. This may be indicative that these populations underwent a long process of genetic diversification, sharing a deep-in-time ancestry, most probably based on processes of reproductive isolation, genetic drift, population expansions and recent migratory movements. The presence of all four major Amerindian haplotypes in the studied area is consistent with their Amerindian background. The mtDNA sequences obtained show that the populations from Beni include ancestral lineages that probably result from isolation and long-term tribalization processes, rather than from admixture with ancient migrants from distant regions. The genetic isolation of local groups may have induced an early reduction in gene flow, allowing the differentiation through genetic drift and natural selection. However the environmental constraints imposed by geographic and demographic pressures may also have favoured, at least to a certain extent, genetic admixture among local populations.

The presence of distinct lineages, not described in other Amerindian groups so far, in nearly all haplogroups of the studied sample suggests either that the population from Beni did not pass through a bottleneck or that recent processes of migration and genetic admixture took place in the area. Both processes may account for the high levels of genetic diversity observed. For instance, the Moxo populations may result from the aggregation of a great number of Arawakan-speaking populations 'reduced' by the Jesuits in the sixteenth century, whereas other tribes, such as the Movima, originated from reductions formed by groups with a single ethnic origin. Likewise, the Movima population, which belongs to the Macro-Tucanoan-speaking stock (Ruhlen 1991), was partially integrated into the Arawakan populations after migration from its original distribution area, carrying its own distinctive genetic characteristics and evolutionary history.

Such patterns of complex demographic interactions among local and migrant groups produced a highly heterogeneous genetic background in the Beni region. However, the AMOVA values observed suggest that the intra-tribal genetic homogeneity is higher than the intra-regional genetic homogeneity. This is consistent with the hypothesis of an early tribalization process that significantly reduced the gene flow between populations. Therefore, the reproductive isolation of small demes and genetic drift can be claimed as the major diversifying forces of the South Amerindian populations and for the lowlands in the Amazonian region, as suggested by Merriwether *et al.* (1995). The concordance of high genetic, linguistic and cultural variability in the Beni area also supports this view. Nevertheless, the role of recent migratory movements, genetic admixture, and gene flow among local populations cannot be ruled out, although population size bottlenecks or expansions may not have been of major significance in the studied area. Torroni *et al.* (1993) have suggested that a high incidence of private mtDNA polymorphisms and a limited distribution of

shared mtDNA mutations may support a hypothesis of early tribalization model for Native Americans, which seems to be the case also for the Beni region. In conclusion, The Moxo populations might have resulted from a continued process of colonization, without significant population bottleneck processes, and with limited admixture between linguistic stocks, at least until the generalization of the Jesuitic 'reductions'. The genetic influence of Andean, high-altitude adapted populations in the Beni area, though still unknown, might not have been of great relevance.

Acknowledgements

This study was funded by the DGICYT Projects PB-93-0021 and PB-96-1485 from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. We are grateful to Dr Castro of San Ignacio Hospital, Dra. Greet Diltiens and Dra. Roser Montagut for their co-operation in the recollection of samples. We are also grateful to Dr J. Cerdà of Laboratorio de Biología 'San Calixto' from La Paz, Bolivia, for his help.

References

- ANDERSON, S., BANKIER, A. T., BARRELL, B. G., DE BRUIJN, M. H., COULSON, A. R., SANGER, F., SCHREIER, P. H., SMITH, A. J. H., STADEN, R., and YOUNG, G., 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457–465.
- BANDELT, H. J., FORSTER, P., and RÖHL, A., 1999, Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.
- BARNADAS, J. M., 1985, *Introducción a la obra del P. Eder: Breve descripción de las Reducciones de Mojos* (Cochabamba: Historia Boliviana).
- BATISTA, O., KOLMAN, C. J., and BERMINGHAM, E., 1995, Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panama. *Human Molecular Genetics*, **4**, 921–929.
- BERT, F., CORELLA, A., GENÉ, M., PÉREZ-PÉREZ, A., and TURBÓN, D., 2001, Major mitochondrial DNA haplotype heterogeneity in highland and lowland Amerindian populations from Bolivia. *Human Biology*, **73**, 1–16.
- BLOCK, D., 1980, In search of El Dorado: Spanish entry into Moxos, a tropical frontier, 1550–1767. Dissertation, Faculty of the Graduate School of The University of Texas, Austin.
- DENEVAN, W., 1966, *The Aboriginal Cultural Geography of the 'Llanos de Moxos' of Bolivia* (Berkeley-Los Angeles: Ibero-Americana).
- DIXON, E. J., 2001, Human colonization of the Americas: timing, technology and process. *Quaternary Science Reviews*, **20**, 277–279.
- ERICKSON, C. L., 1999, Neo-environmental determinism and agrarian 'collapse' in Andean prehistory. *Antiquity*, **73**, 634–642.
- EXCOFFIER, L., and LANGANEY, A., 1989, Origin and differentiation of human mitochondrial DNA. *American Journal of Human Genetics*, **44**, 73–85.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E., and QUATTRO, J. M., 1992, Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **139**, 479–491.
- FELSENSTEIN, J., 1993, PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6c. Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- FORSTER, P., HARDING, R., TORRONI, A., and BANDELT, H. J., 1996, Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *American Journal of Human Genetics*, **59**, 935–945.
- GANTIER, B., 1991, Indios de Mojos y Jesuitas: orígenes de una cristiandad. Audiencia de Charcas. Siglos XVII y XVIII. Dissertation, Faculty of the Theology of the University of Comillas, Madrid.
- GINTHER, C., CORACH, D., PENACINO, G. A., REY, J. A., CARNESE, F. R., HUTZ, M. H., ANDERSON, L. E., JUST, J., SALZANO, F. M., and KING, M. C., 1993, Genetic variation among the Mapuche Indians from the Patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes. In *DNA Fingerprints: State of the Art*, edited by S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J. T. Epplen and A. J. Effreys (Basel: Birkhauser), pp. 211–219.
- HANDT, O., MEYER, S., and Von HAESELER, A., 1998, Compilation of human mtDNA control region sequences. *Nucleic Acids Research*, **26**, 126–129.
- HIGGINS, D. G., BLEASBY, A. J., and FUCHS, R., 1992, CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Cabios*, **8**, 189–191.
- HORAI, S., and HAYASAKA, K., 1990, Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *American Journal of Human Genetics*, **46**, 828–842.

- KITTLES, R. A., BERGEN, A. W., URBANEK, M., VIRKKUNEN, M., LINNOILA, M., GOLDMAN, D., and LONG, J. C., 1999, Autosomal, mitochondrial, and Y chromosome DNA variation in Finland: evidence for a male-specific bottleneck. *American Journal of Physical Anthropology*, **108**, 381–399.
- KOLMAN, C. J., BERMINGHAM, E., COOKE, R., WARD, R. H., ARIAS, T. D., GUIONNEAU-SINCLAIR, F., 1995, Reduced mtDNA diversity in the Ngöbe Amerinds of Panamá. *Genetics*, **140**, 275–283.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I. B., and NEI, M., 2001, MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- LATHRAP, D. W., 1970, *The Upper Amazon* (Southampton: Thames and Hudson).
- LYNCH, T. F., 1983, The Paleo-indians. In *Ancient South Americans*, edited by J. D. Jennings (San Francisco: W. H. Freeman), pp. 87–138.
- MERRIWETHER, D. A., ROTHHAMMER, F., and FERRELL, R. E., 1995, Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *American Journal of Physical Anthropology*, **98**, 411–430.
- MORAGA, M., ASPILLAGA, E., SANTORO, C., STANDEN, V., CARBALLO, P., and ROTHHAMMER, F., 2001, mtDNA analysis of mummies from northern Chile endorse the hypothesis of an Amazonian origin of Andean populations. *Revista Chilena de Historia Natural*, **74**, 719–726.
- NEI, M., 1987, *Molecular Evolutionary Genetics* (New York: Columbia University Press).
- NICHOLS, J., 2000, Estimating dates of early American colonization events. In *Time Depth in Historical Linguistics*, vol. 2, edited by C. Renfrew, A. McMahon and L. Trask (Cambridge: The McDonald Institute for Archaeological Research), pp. 643–654.
- NOBLE, G. K., 1965, *Proto-Arawakan and its Descendants* (The Hague: Mouton and Co./University of Indiana).
- PARSON, T. J., MUNIEC, D. S., SULLIVAN, K., WOODYATT, N., ALLISTON-GREINER, R., WILSON, M. R., BERRY, D. L., HOLLAND, K. A., WEEDN, V. W., GILL, P., and HOLLAND, M. M., 1997, A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature Genetics*, **15**, 363–368.
- ROTHHAMMER, F., LOP, E., CARVALLO, P., and MORAGA, M., 2001, Origin and evolutionary relationships of native Andean populations. *High Altitude Medicine and Biology*, **2**, 227–233.
- RUHLEN, M., 1991, *A Guide to the World's Languages* (Stanford: University Press).
- SAIGNES, T., 1985, *Los Andes orientales: historia de un olvido* (Cochabamba: Estudios Históricos).
- SANTOS, M., WARD, R. H., and BARRANTES, R., 1994, mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Human Biology*, **66**, 963–977.
- SANTOS, S. E. B., RIBEIRO DOS-SANTOS, H. K. C., MEYER, D., and ZAGO, M. A., 1996, Multiple founder haplotypes of mitochondrial DNA in Amerindian revealed by RFLP and sequencing. *Annals of Human Genetics*, **60**, 308–319.
- SCHNEIDER, S., and EXCOFFIER, L., 1999, Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, **152**, 1079–1089.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D., and EXCOFFIER, L., 2000, Arlequin ver. 2000: a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- STEWART, J., 1949, *Handbook of South American Indians*. American Ethnology Bulletin No. 143, Smithsonian Institution, Washington, DC.
- TAJIMA, F., 1989, Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- TORRONI, A., SCHURR, T. G., CABELL, M. F., BROWN, M. D., NEEL, J. V., LARSEN, M., SMITH, D. G., VULLO, C. M., and WALLACE, D. C., 1993, Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics*, **53**, 563–590.
- WALSH, P. H., METZGER, D. A., and HIGUCHI, R., 1991, Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, **10**, 506–513.
- WARD, R. H., FRAZIER, B. L., DEW-JAGER, K., and PAABO, S., 1991, Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88**, 8729–8724.
- WARD, R. H., SALZANO, F. M., BONATTO, S. L., HUTZ, M. H., COIMBRA C. E. A. JR., and SANTOS, R. W., 1996, Mitochondrial DNA polymorphism in three Brazilian tribes. *American Journal of Human Biology*, **8**, 317–323.

Address for correspondence: Dr D. Turbón, Secc. Antropología, Dpto Biología Animal, Fac. Biología, Universidad de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. email: turbon@ub.edu

Zusammenfassung. *Hintergrund:* Movima, Yuracare, Ignaciano und Trinitario sind indianische Bevölkerungen, die im Unterland Boliviens im Amazonasbecken leben. Über die kulturellen und genetischen Ähnlichkeiten der in diesem Gebiet lebenden Populationen ist trotz vieler archäologischer Untersuchungen, die ihre Bedeutung in präkolumbischer Zeit demonstrieren, sehr wenig bekannt. Bevölkerungsreiche indianische Gruppen okkupierten die Region sowohl in den Llanos und entlang der

Flüsse des Amazonasbeckens und betrieben Landwirtschaft und Gütertausch. Die historischen und linguistischen Aufzeichnungen deuten darauf hin, daß das Land durch aufeinander folgende Migration besiedelt wurde, was einen Anstieg zu komplexen sozio-ökonomischen Gemeinschaften zur Folge hatte. Die genetischen Informationen deuten darauf hin, daß die Besiedelung des amerikanischen Erdteils aus der Sicht der Emigranten relativ einfach war, aber andere Evolutionsprozesse, wie zum Beispiel genetische Drift oder natürliche Selektion, könnten auch den genetischen Hintergrund der gegenwärtigen Bevölkerungen der Beni-Region geformt haben.

Ziel: Das Ziel dieser Studie ist es, die genetische Vielfalt dieser Bevölkerungen durch eine Analyse der Sequenzvariabilität der HVR-I kontrollierten Region der mitochondrialen DNA (mtDNA) zu beschreiben. Der indianische Ursprung dieser Bevölkerungen deutet darauf hin, daß enge genetische Ähnlichkeiten zwischen den hier untersuchten Beni-Gruppen und anderen indianischen Gruppen offensichtlich sind.

Jedoch könnten auch die komplexen Prozesse der Populationsinteraktionen und/oder Isolation in der Beni-Region in unerwarteten genetischen Ähnlichkeiten resultieren.

Material und Methoden: Die DNA wurde extrahiert aus gezogenen Haaren, die *in situ* von nicht verwandten Individuen der Beni-Region in Bolivien stammten. Die DNA wurde mit Hilfe der Standard Chelex™ 100 Methode extrahiert und ein 401 bp DNA Bruchstück der HVR-I Region unter Benutzung spezifischer Primer (L-15978 und H-16412) amplifiziert. Die DNA-Amplifikate wurden durch Zentrifugation mit Hilfe der Microspin™ S-300 HR columns gereinigt und beide SNA Stränge nach asymmetrischer PCR unter Benutzung des Dye-Terminator 2 Sequencing Kids (Perkin-ELMER) sequenziert. Für jede Probe wurden zwei unabhängige 401 und 328 bp DNA Bruchstücke separat sequenziert. Die Sequenzanalysen schlossen mismatch-Verteilungen und mittlere paarweise Differenzen, Median-Netzwerk-Analysen und Neighbour-Joining sowie Maximum-Likelihood Phylogenievergleiche ein. Die genetische Vielfalt der DNA Sequenzen wurde ebenfalls mit verschiedenartigen Möglichkeiten für die untersuchten Proben gemessen und es wurden UPGMA-Bäume gezeichnet, einschließlich einer großen Anzahl von Sequenzen südamerikanischer Indianer.

Ergebnisse: Die genetische Vielfalt der 401 Nukleotid langen mtDNA Sequenzen in der hypervariablen Kontrollregion von den Positionen 16000 bis 16400 wurde in einer Probe von 54 Amerindians, die in den Llanos de Moxos leben, charakterisiert. Es wurden insgesamt 34 distinkte Abstammungen beobachtet, definiert durch 41 variable Nukleotidpositionen; 71% aller Abstammungen waren Einzelsequenzen. Alle vier größeren indianischen Haplogruppen waren nachweisbar (A 18,5% $n = 10$; B 24,1% $n = 13$; C 50,0% $n = 27$ und D 5,6% $n = 3$). Die Median-Netzwerk-Analyse zeigte Hinweise darauf, daß die Prozesse der Bevölkerungsexpansion in der Beni-Region stattfanden. Jedoch war keine eindeutige Haplotypdifferenzierung durch Bevölkerungen nachweisbar. Innerhalb der Proben waren ein hoher Grad der molekularen Variabilität und eine bimolare paarweise mismatch-Verteilung zu sehen. Die Analysen der molekularen Varianz (AMOVA) zeigten, daß die meisten der beobachteten Varianzen auf Intrapopulationsvariabilität zurückzuführen sind und die größte Zwischengruppenvarianz beobachtet werden konnte, wenn linguistische Klassifikationskriterien verwendet wurden. Der phylogenetische Vergleich legt einzigartige Abstammungen in der Beni-Region offen, von denen bisher von anderen indianischen Populationen nicht berichtet wurde.

Schlußfolgerungen: Die genetische Verteilung, die in der Beni-Region beobachtet wurde, ist größer als bei anderen bisher untersuchten amerikanischen Bevölkerungen, die in einem viel größeren Gebiet leben und eine längere, bekannte Entwicklungsgeschichte haben, trotz des eingeschränkten Areals von Moxos. Dies könnte das Resultat aus Prozessen reproduktiver Isolation zwischen den Gruppen sein, gefolgt von Bevölkerungsexpansion und Migration, wobei die größte entwicklungsmäßige Kraft bei der Populationsdifferenzierung die genetische Drift haben könnte.

Resume. Arrière-plan: Les Movima, Yuracare, Ignaciano et Trinitario sont des populations amérindiennes vivant dans les basses terres du bassin amazonien de Bolivie. On sait peu de choses quant aux affinités culturelles et génétiques des populations de cette région en dépit de nombreuses recherches archéologiques qui ont montré son importance pendant la période pré-colombienne. Des groupes amérindiens occupaient densément la région, aussi bien dans le Llanos que le long des cours d'eau du bassin de l'Amazone, pratiquant d'intenses activités culturelles et d'échanges de marchandises. Les documents historiques et linguistiques indiquent que le territoire a été occupé à la suite de migrations successives qui ont donné naissance à des communautés socio-économiques complexes. Les informations génétiques suggèrent que la colonisation du continent américain a été relativement simple du point de vue migratoire, mais d'autres processus évolutifs comme la dérive génique ou la sélection naturelle auraient pu modeler le patrimoine génétique des populations actuelles de la région du Béni.

But: Cette étude cherche à caractériser la diversité génétique de ces populations par l'analyse de la variabilité de séquence de la région de contrôle de HVR-I de l'ADN mitochondrial (ADNmt). L'origine amérindienne de ces populations laisse supposer l'existence de fortes similitudes génétiques entre ces échantillons du Béni et d'autres groupes amérindiens, mais les interactions complexes de ces populations ainsi que les isolements qu'elles ont pu traverser dans cette région, pourraient se traduire par des affinités génétiques inattendues.

Sujets et méthodes: L'ADN a été extrait de cheveux prélevés *in situ* sur des personnes ne partageant pas de parenté proche et qui vivaient dans le département du Béni en Bolivie. L'ADN a été extrait par une

método ChelexTM 100 standard et un fragment d'ADN de 401 bp de la région HVR-I, amplifié à l'aide des primers spécifiques (L-15978 et H-16412). Les amplicons d'ADN ont été purifiés par centrifugation par des colonnes MicrospinTM S-300 HR et les bandes SNA séquencées après PCR asymétrique par le matériel de séquençage Dye-Terminator 2. Deux fragments d'ADN indépendants de 401 et 328 bp ont été séquencés séparément pour chaque échantillon. Les séquences d'analyse incluent les distributions de non concordance, les différences moyennes par paires, l'analyse médiane de réseau et les comparaisons phylogénétiques par maximum de vraisemblance de la jonction de voisinage. La diversité génétique des séquences d'ADN a également été mesurée de différentes manières pour l'échantillon étudié et des dendrogrammes UPGMA incluant un grand nombre de séquences sud-américaines ont été tracés.

Résultats: La diversité génétique de séquences longues de 401 nucléotides de l'ADNmt dans la région de contrôle hypervariable entre les positions 16000–16400 a été caractérisée dans un ensemble de 54 amérindiens vivant dans le Llanos de Moxos. On a observé un total de 34 lignages distincts définis par 41 positions variables de nucléotides et 71% de tous les lignages étaient des séquences uniques. Quatre haplogroupes amérindiens majeurs ont été détectés (A 18,5%, $n = 10$; B 24,1%, $n = 13$, C 50,0%, $n = 27$; and D 5,6%, $n = 3$). L'analyse médiane de réseau suggère que des processus d'expansion de population se sont produits dans la région du Béni, bien qu'on n'ait pu détecter aucune différenciation populationnelle d'haplotype. De hauts niveaux de variabilité moléculaire et une distribution bimodale de non concordance par paire ont été constatés. Les analyses moléculaires de variance (AMOVA) montrent que la plus grande partie de la variabilité observée est d'ordre intrapopulationnelle et que les plus fortes variances intra-groupe sont obtenues lorsqu'on utilise des critères linguistiques de classification. La comparaison phylogénétique révèle dans des zones du Béni, des lignages uniques qui n'ont pas été décrits chez d'autres populations amérindiennes.

Conclusions: La diversité génétique observée dans la région du Béni est malgré l'exiguïté de la région de Moxos, plus élevée que celle d'autres populations américaines dont on connaît la longue histoire et qui vivent dans des aires beaucoup plus vastes. Ceci pourrait provenir de processus d'isolement génétique entre les groupes, suivis d'expansions et de migrations, dans lesquelles la dérive génétique pourrait avoir tenu un rôle de différenciation majeur.

Resumen. *Antecedentes:* Movima, Yuracare, Ignaciano y Trinitario son poblaciones amerindias que habitan las tierras bajas bolivianas de la cuenca amazónica. La afinidad cultural y genética de las gentes que habitan este área es poco conocida, a pesar de los muchos estudios arqueológicos que demuestran su importancia en las épocas precolombinas. La región estuvo ocupada por grupos amerindios, densamente poblados, tanto en los Llanos como a lo largo de los ríos de la cuenca del Amazonas, que practicaban actividades de agricultura intensiva e intercambio de bienes. Los registros históricos y lingüísticos indican que la tierra fue ocupada a través de sucesivas migraciones que dieron lugar a complejas comunidades socioeconómicas. La información genética sugiere que la colonización del continente americano fue bastante simple desde el punto de vista de la emigración, pero otros procesos evolutivos, como la deriva genética o la selección natural, podrían haber modelado también el patrimonio genético de las poblaciones actuales en la región de Beni.

Objetivo: El objetivo de este estudio es caracterizar la diversidad genética de estas poblaciones, mediante el análisis de la variabilidad de la secuencia de la región control HVR-I del ADN mitocondrial (ADNmt). El origen amerindio de estas poblaciones sugiere que deberían ser evidentes las estrechas similitudes genéticas entre las muestras Beni aquí estudiadas y otros grupos amerindios. Sin embargo, los complejos procesos de interacción entre poblaciones y/o de aislamiento en la región Beni podrían manifestarse en afinidades genéticas no esperadas.

Sujetos y Métodos: Se extrajo el ADN a partir de cabellos con raíz, obtenidos *in situ* de individuos no emparentados estrechamente, que residían en el Departamento Beni de Bolivia. El ADN se extrajo utilizando un método estándar ChelexTM 100 y se amplificó un fragmento de ADN de 401 pb de la región HVR-I utilizando primers específicos (L-15978 y H-16412). Los amplicones de ADN fueron purificados por centrifugación utilizando columnas MicrospinTM S-300 HR y ambas hebras SNA fueron secuenciadas después de una PCR asimétrica, utilizando un kit de secuenciación directa Dye-Terminator 2 (Perkin-Elmer). Se secuenciaron dos fragmentos de ADN independientes de 401 y 328 pb por separado en cada muestra. Los análisis de secuencias incluyen distribuciones mal emparejadas ("mismatch") y diferencias medias entre pares, análisis "median network" y agrupamiento del vecino más próximo ("neighbour joining"), y comparaciones filogenéticas por máxima verosimilitud. La diversidad genética de las secuencias de ADN se midió también de varias formas en la muestra estudiada y se diseñaron 3 árboles UPGMA, que inclúan un gran número de secuencias de amerindios del sur.

Resultados: Se caracterizó la diversidad genética de secuencias de ADNmt de 401 nucleótidos de longitud en la región control hipervariable, desde las posiciones 16.000 a 16.400, en una muestra de 54 amerindios residentes en los Llanos de Moxos. Se observaron un total de 34 linajes diferentes, definidos por 41 posiciones nucleotídicas variables, y un 71% de todos los linajes fueron secuencias únicas. Se detectaron los 4 haplogrupos amerindios principales (A 18,5%, $n = 10$; B 24,1%, $n = 13$, C 50,0%, $n = 27$; y D 5,6%, $n = 3$). El análisis "median network" sugiere que en la población Beni tuvieron lugar procesos de expansión poblacional. Sin embargo, no se pudo detectar una diferenciación haplotípica clara entre poblaciones. Dentro de la muestra se han observado elevados niveles de variabilidad molecular y una distribución

“mismatch” bimodal entre pares. Los análisis de la varianza molecular (AMOVA) mostraron que la mayor parte de la varianza observada se debía a la variabilidad intrapoblacional, y que la mayor varianza entre grupos se obtuvo cuando se utilizó un criterio de clasificación lingüístico. La comparación filogenética reveló linajes únicos en las áreas Beni, no reportados para otras poblaciones amerindias.

Conclusiones: A pesar de lo reducido del área de Moxos, la diversidad genética observada en el área Beni es mayor que la observada en otras poblaciones amerindias residentes en áreas mucho mayores y con una historia evolutiva larga y conocida. Esto podría ser el resultado de procesos de aislamiento reproductor entre grupos, seguido por expansiones y migración de la población, donde la deriva genética podría haber sido una fuerza evolutiva principal en la diferenciación de la población.

3.6

Annals of Human Biology, January–February 2007; 34(1): 34–55

informa
healthcare

ORIGINAL ARTICLE

Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian populations living in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Mosesten, Aymara and Quechua

ALFONS CORELLA¹, FRANCESC BERT¹, ALEJANDRO PÉREZ-PÉREZ¹,
MANEL GENÉ², & DANIEL TURBÓN¹

¹*Secció Antropologia, Facultat de Biologia, Departament de Biologia Animal, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, 08 028 Barcelona, Spain and* ²*Facultat de Medicina, Laboratori de Genètica Forense, Departament de Medicina Legal, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

Se han realizado pocos estudios que intenten dilucidar el poblamiento de las regiones de contacto entre el altiplano Andino y la cuenca Amazónica. El presente estudio, basado en la descripción y comparación de la región hipervariable I del ADN mitocondrial de poblaciones Andinas y del Piedemonte de Bolivia intenta aportar información sobre el poblamiento de esta región y su historia demográfica. El Piedemonte boliviano corresponde a la región de transición entre los valles y serranías más occidentales de los Andes, denominadas Yungas y las llanuras más orientales de la región amazónica (Llanos de Moxos). El área está habitada por poblaciones Mosesten y Chimane de habla Pano y en las zonas más elevadas correspondientes a la zona andina poblaciones Quechua y Aymará.

Aunque existen algunas controversias, parece que durante el poblamiento de la región, todos los estratos ecológicos fueron rápidamente ocupados tanto las zonas altiplánicas como en las costeras y amazónicas. Según Salzano y Callegari-Jacques (1988) el altiplano debió actuar como un corredor norte-sur para los humano asentados en la zona pero el paso a regiones tropicales dista mucho de ser determinado. Rothhammer et al. (2001), observando el análisis entre la distancia genética de poblaciones andinas y amazónicas; sugirió la existencia

de dos rutas principales de migración en Sudamérica a partir del istmo de Panamá a finales del Pleistoceno. La primera migración desplazándose hacia el sur a lo largo de la región andina de Colombia, Ecuador y Perú hasta llegar al noroeste de Argentina, este de Brasil y pampa Argentina y una segunda migración desplazándose hacia el este hasta Venezuela y el sur de la Guayana para más tarde adentrarse hasta la región amazónica de Brasil desde donde, siguiendo los cursos de los ríos amazónicos, se expandieron al este y al oeste hasta llegar a las primeras estribaciones de la cordillera andina hace unos 3,500 años. Las actuales poblaciones andinas serían los descendientes de estas poblaciones de origen amazónico.

El total de población Chimane ronda los 4000 individuos Díaz Astete y Murillo (1998) y se distribuyen en las cuencas altas del río Beni, es una población seminómada que desplazan su asentamiento de forma estacional siguiendo la disponibilidad de los recursos, practican una agricultura aparentemente rudimentaria donde las plantas cultivadas son la yuca, el camote y el maíz. La primera información de esta población data de 1621 con la llegada del cura franciscano Gregorio de Bolívar (Chichón 1992) que llegó al alto Beni con la intención de cristianizar a las etnias de la región, después de éste hubo a lo largo de siglos diferentes tentativas para introducir la religión católica. (D'Orbigny 1944, Vargas Ugarte 1964, Altamirano, 1979).

La población Mosaic se estima en unos 1300 individuos Díaz Astete y Murillo (1998) que se distribuyen en las colinas más orientales de los Andes, los Mosaic acostumbran a realizar pequeños desplazamientos en busca de terrenos agrícolas adecuados cuando los originales pierden su fertilidad, cultivan arroz, yuca y cacao, como los Chimane con los que comparten una lengua semejante y unas prácticas de a la pesca, caza y recolección parecidas.

Por otro lado la población Quechua constituye, en número la principal etnia de la zona Andina y Subandina, la lengua Quechua junto la Maya y la Guaraní es una de las tres lenguas autóctonas más habladas en Sudamérica.

La población Aymará que vive alrededor del lago Titicaca en Bolivia y Perú constituye otro grupo humano en la región andina.

El ADN se extrajo a partir de muestras de bulbos capilares extraídas “*in situ*”.

Se estudiaron un total de 46 muestras de individuos no emparentados de los asentamientos Fátima de Chimanés, Santa Ana de Mosaic, Yucumo, Totaizal, San Borja y Palos Blancos. Las muestras fueron guardadas en tubos Eppendorf estériles hasta el laboratorio donde se procedió a su análisis. Todas las muestras fueron recogidas en base a los

estándares éticos del comité responsable en experimentación humana y con la Declaración de Helsinki de 1975 y revisada en 1983.

Todos los individuos dieron su consentimiento para la obtención de muestras.

La extracción de ADN se realizó utilizando ChelexTM 100 tal y como describe Walsh et al. (1991). Se analizó un fragmento de 401 pares de bases de la región de control del segmento I (HVSI) del ADN mitocondrial desde la posición 16,000 a la 16,400. Los fragmentos de las dos cadenas de ADN se amplificaron utilizando los primers:

L-15978 (5'-CTACGCCAATCACTTTATTG-3')

H-16412 (5'-GTGCGGGATATTGATTTTAC-3')

Siguiendo los protocolos estándar de la PCR. Después de su purificación con columnas MicrospinTM S-300 HR (Pharmacia, Biotech) ambas cadenas de ADN fueron secuenciadas directa y separadamente en una PCR asimétrica usando los primers o cebadores:

L-15995 (5'-AATTCTCACCCCTAGCTCC-3') y

H-16402 (5'-TGATTTACGGAGGATGGT-3')

Utilizando los protocolos estándar recomendados (Dye-Terminator 2, Perkin-Elmer) para la secuenciación directa automática.

La purificación del producto se realizó mediante precipitación de Fenol/Etanol y el producto resultante se analizó con un secuenciador ABI PRISM 3700 en los Serveis Científico-Tècnics (SCT) de la Universidad de Barcelona.

Se realizaron dos tipos de análisis de las secuencias de ADN para cada población: la primera utilizando el fragmento de 401 pb y otro más corto de 328 pb coincidente con el fragmento más utilizado en la literatura sobre otras poblaciones Sudamericanas. Las secuencias fueron comparadas con la secuencia de referencia de Cambridge (Anderson et al. 1981).

Las secuencias fueron alineadas el programa CLUSTAL V (Higgins et al. 1992) y se eliminaron del análisis las variaciones homopoliméricas de citosina comprendidas entre las posiciones 16182 i 16186.

Los individuos habían sido previamente tipados y asignados a cada uno de los cuatro haplogrupos de ADN mitocondrial utilizando enzimas de restricción (Bert et al. 2001).

Las secuencias se analizaron para el fragmento de 401 pb, se observaron las diferencias de secuencia, la "mismatch distribution" y el "mean pairwise" utilizando el programa ARLEQUÍN 2001 (Schneider et al. 2000). La diversidad génica se estimó con el

índice de Nei (1987). También se calculó el estadístico F_s (Fu 1997) y la variabilidad intrapoblacional (Ewens 1972). Se infirió un árbol filogenético “*neighbour-joining*” utilizando el programa PHYLIP (Felsenstein 1993).

Para analizar la proporción de variabilidad genética intra e inter poblacional de las poblaciones estudiadas con otras poblaciones de Sudamérica (Tabla 4, ver artículo) y así hallar el grado de afinidad de las poblaciones del Piedemonte con las Andinas y las Amazónicas se realizó el análisis AMOVA utilizando el programa ARLEQUÍN 2001 (Schneider et al. 2000).

También se realizó un análisis de componentes principales de los haplogrupos de ADNmt utilizando el programa XLSTAT (7.5.2) (Fahny 1995)

La tabla 1 (ver artículo) muestra las 46 secuencias de la región HVSI del ADNmt agrupadas por afiliación étnica. Se observan 37 posiciones nucleotídicas variables y un 66,7 % de los linajes son secuencias únicas. El 19,6 % de las secuencias pertenecen al haplogrupo A, 69,5 % al haplogrupo B, tan solo una secuencia pertenece al haplogrupo C y tres al haplogrupo D, además una secuencia, (Chimane 150) no pertenece a ninguno de los cuatro linajes mitocondriales y se ha clasificado como “otros”.

La figura 2 (ver artículo) muestra las relaciones entre las secuencias mediante “*median-network plot*”. La mayor parte de las secuencias quedan agrupadas por haplogrupos y se hallaron haplotipos idénticos en secuencias del presente estudio con poblaciones del Centro y Sur América, la población Quechua se encuentra en la mayoría de los nodos del gráfico que sigue una morfología radial; indicativa de una expansión poblacional, Forster et al. (1996)

La “*mismatch distribution*” del conjunto de poblaciones muestra un patrón bimodal con un máximo principal para una diferencia y otro máximo secundario para siete diferencias, la media de diferencias *pairwise* es de $4,66 \pm 0,97$.

Los parámetros de diversidad genética se han aplicado para todas las poblaciones utilizando el fragmento corto de 328 pb de ADN. El valor más bajo de diversidad nucleotídica fue de 0,0065 en la población Aymará y el valor más alto fue 0,0240 en la población Mositén. Los resultados fueron similares cuando se utilizó el índice *mean pairwise differences*.

Cuando se aplicó el índice de diversidad génica, los valores más bajos se hallaron en poblaciones de Centro América como los Kuna con valores de 0,59 mientras que los Quechua de la región de Arequipa, en los Andes obtuvieron valores de 0,98.

Para comparar las poblaciones del Piedemonte andino con otras poblaciones originarias del Centro y Sur de América, se analizaron 346 secuencias: Mapuche (Ginther et al. 1993), Zoro, Gavaio y Xavante (Ward et al. 1996), Ngobe (Kolman et al. 1995), Huetar (Santos et al. 1994) Quechua de Arequipa, Tayacaja, Quechua-Nmatsinguenga (Fuselli et al. 2003), Ancash (Lewis et al. 2004) Yanomama (Torroni et al. 1993) y Taino (Lalueza et al. 2001).

La tabla 4 (ver artículo) muestra los valores de la matriz de distancia genética usando la distancia genética de Tamura y Nei (1993), a partir de los valores de la distancia genética se generó un árbol *neighbour-joining* donde se observan tres *clusters*.

El análisis de componentes principales presente en la tabla 6 (ver artículo), muestra la distribución de los cuatro haplogrupos en el conjunto de poblaciones estudiadas, la primer componente es responsable del 45,3 % de la varianza y su distribución está correlacionada con la frecuencia de la suma de los haplogrupos A y B *versus* la suma de los haplogrupos C y D. La segunda componente principal es responsable del 28,6 % de la varianza y discrimina respectivamente el haplogrupo A del B y el haplogrupo C del D.

Las poblaciones están gráficamente distribuidas en el PCA en tres grupos geográficos: el primero, constituido por poblaciones de Centro América, presenta frecuencias elevadas del haplogrupo A, el segundo grupo está formado por poblaciones del Norte y el Centro de la región Andina con una frecuencia alta del haplogrupo B, el tercer grupo constituido por poblaciones del Sur Andino y la Amazonia, con frecuencias elevadas de los haplogrupos C y D. Existen algunas excepciones a esta distribución como es el caso de los Boruca de Centro América, los Xavante y Kraho de Brasil y los Ache de Paraguay que se ubican en el grupo central andino y los Piaroa y Cayapa, poblaciones amazónicas que quedan fuera del *cluster* amazónico.

Las poblaciones del Piedemonte del Beni quedan en el grupo Norte Central Andino, las poblaciones Aymará y Quechua del Beni pertenecen mayoritariamente al haplogrupo B y quedan cercanos en el cluster, otras poblaciones Aymará y Quechua de otras regiones muestran valores altos de variabilidad intragrupal hecho que hace que su distribución en el clúster sea más amplia, las poblaciones Chimane y Mositén quedan también en el mismo clúster pero más separados. La afinidad de las poblaciones del Piedemonte del Beni con el grupo central andino se observa también cuando se aplica el análisis AMOVA indicando que el criterio lingüístico es el que mejor explica la agrupación.

La mayoría de autores han señalado la existencia de dos áreas de discontinuidad genética en Sudamérica, la zona Andina y la zona Amazónica. La primera está caracterizada por la cordillera andina y las serranías pre-andinas que debieron ser colonizadas siguiendo la línea de costa del pacífico así como el corredor del altiplano como una vía natural hace aproximadamente 12 000 años. La segunda zona incluye toda la cuenca amazónica que se debió colonizar desde la costa atlántica utilizando los cursos fluviales para llegar a los distintos ecosistemas amazónicos. Las zonas más australes del continente se poblaron a partir de la costa tanto atlántica como pacífica a partir de pequeños grupos de cazadores recolectores en diferentes olas migratorias. Las poblaciones que actualmente viven en esta región presentan afinidad genética con las poblaciones amazónicas.

El Piedemonte es una región de transición entre las zonas mencionadas y la caracterización genética de las poblaciones que allí viven es todavía incompleta para revelar el papel de ésta región en el poblamiento de Sudamérica. El presente estudio intenta dilucidar si las poblaciones del Piedemonte presentan una mayor similitud con las andinas o con las amazónicas o bien si son un grupo con características propias distinto de sus vecinos.

Desde un punto de vista ecológico el ecosistema predominante del Piedemonte es el de bosque tropical con pequeñas zonas sub-tropicales, existe pues una mayor influencia de los ambientes amazónicos. Los patrones de asentamiento son también similares a los de poblaciones típicamente amazónicas formados por pequeñas poblaciones dispersas. Los resultados obtenidos en el análisis PCA, AMOVA y de distancias genéticas, revelan que las poblaciones que viven en el Piedemonte muestran una mayor similitud con el *pool* de poblaciones del Centro y del Norte de los Andes que con las del Sur de los Andes o las de la Amazonía. Estos resultados son los que cabría esperar de las poblaciones Aymará y Quechua que mayoritariamente han vivido en la región andina, pero no para las poblaciones Chimane y Mosestén que presentan características más propias de la zona amazónica. Los árboles filogenéticos derivados de las distancias genéticas tienden a agrupar las poblaciones por proximidad geográfica y afinidad lingüística, las poblaciones del Piedemonte se agrupan evidenciando un grado de flujo génico entre ellas, el hecho que la población Quechua del Piedemonte beniano muestre una mayor afinidad genética con la población Aymará del Beni que con otras poblaciones Quechua puede deberse a peculiaridades histórico-geográficas de estas poblaciones. En la región Norte y Central de los Andes donde se desarrollaron sociedades complejas durante siglos, hubo un aumento de la densidad poblacional (Stanish 2001) que permitió un mayor flujo génico en la región. La vasta zona andina debió funcionar

como un territorio de homogenización genética comparado con otros hábitats de Sudamérica. No está claro si la existencia de sociedades complejas y altamente jerarquizadas operaban como una barrera genética que evitase el flujo génico en poblaciones que, no olvidemos, ocuparon un mismo territorio y que tenían sistemas económicos y culturales muy parecidos durante siglos.

Al borde la zona andina, el Piedemonte, valles de Ecuador, Perú y Bolivia los grupos más periféricos de población Quechua experimentaron en diferente grado una mezcla genética con las poblaciones autóctonas, así mismo pasaron por diversos procesos de deriva genética que produjo la diferenciación genética que observamos en la actualidad. Las poblaciones Quechua del presente artículo serían un ejemplo de éste último caso.

Los valores obtenidos para algunos parámetros genéticos a partir de las secuencias del ADNmt en las poblaciones estudiadas indican que la diversidad genética en la región es mayor que en otras grandes regiones de Sudamérica, éstos valores altos de diversidad genética pueden indicar que la población del Piedemonte no haya pasado por un “cuello de botella” o lo que es más plausible, la existencia de procesos migratorios recientes que implicaron un mestizaje.

Los valores altos de diversidad genética concuerdan con la hipótesis de Salzano y Callegari-Jacques (1988) que el área delimitada por el oeste de Bolivia y el norte del Chaco argentino pudo ser un espacio de convergencia o divergencia genética.

Los resultados obtenidos revelan que el Piedemonte no fue una barrera genética en el proceso de dispersión humana entre la zona andina y amazónica sino más bien un corredor entre estas dos ecoregiones, a pesar de la permeabilidad del área, las poblaciones que vivieron allí mantuvieron de alguna forma su especificidad genética evidenciada por la presencia simultánea de antiguos grupos de habla Tucano, de vestigios de la expansión Arawak que llegaron posteriormente, de poblaciones aisladas que hablan lenguas Pano así como la llegada de poblaciones Aymará y Quechua de la zona andina que migraron a la zona del Piedemonte boliviano.

ORIGINAL ARTICLE

Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian populations living in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Mosenen, Aymara and Quechua

ALFONS CORELLA¹, FRANCESC BERT¹, ALEJANDRO PÉREZ-PÉREZ¹, MANEL GENÉ², & DANIEL TURBÓN¹

¹Secció Antropologia, Facultat de Biologia, Departament de Biologia Animal, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, 08 028 Barcelona, Spain and ²Facultat de Medicina, Laboratori de Genètica Forense, Departament de Medicina Legal, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

(Received 14 February 2006; revised 29 September 2006; accepted 5 October 2006)

Abstract

Background: Chimane, Mosenen Aymara and Quechua are Amerindian populations living in the Bolivian Piedmont, a characteristic ecoregion between the eastern slope of the Andean mountains and the Amazonian Llanos de Moxos. In both neighbouring areas, dense and complex societies have developed over the centuries. The Piedmont area is especially interesting from a human peopling perspective since there is no clear evidence regarding the genetic influence and peculiarities of these populations. This land has been used extensively as a territory of economic and cultural exchange between the Andes and Amazonia, however Chimane and Mosenen populations have been sufficiently isolated from their neighbour groups to be recognized as distinct populations. Genetic information suggests that evolutionary processes, such as genetic drift, natural selection and genetic admixture have formed the history of the Piedmont populations.

Aim: The objective of this study is to characterize the genetic diversity of the Piedmont populations, analysing the sequence variability of the HVR-I control region in the mitochondrial DNA (mtDNA). Haplogroup mtDNA data available from the whole of Central and South America were utilized to determine the relationship of the Piedmont populations with other Amerindian populations.

Subject and methods: Hair pulls were obtained *in situ*, and DNA from non-related individuals was extracted using a standard ChelexTM 100 method. A 401 bp DNA fragment of HVR-I region was amplified using standard procedures. Two independent 401 and 328 bp DNA fragments were sequenced separately for each sample. The sequence analyses included mismatch distribution and mean pairwise differences, median network analyses, AMOVA and principal component analyses. The genetic diversity of DNA sequences was measured and compared with other South Amerindian populations.

Results: The genetic diversity of 401 nucleotide mtDNA sequences, in the hypervariable Control Region, from positions 16 000–16 400, was characterized in a sample of 46 Amerindians living in the Piedmont area in the Beni Department of Bolivia. The results obtained indicate that the genetic

Correspondence: Daniel Turbón, Secc. Antropologia, Fac. Biologia, Dpto Biologia Animal, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 645, Barcelona 08 028, Spain. E-mail: turbon@ub.edu

ISSN 0301–4460 print/ISSN 1464–5033 online © 2007 Informa UK Ltd.
DOI: 10.1080/03014460601075819



diversity in the area is higher than that observed in other American groups living in much larger areas and despite the reduced size of the studied area the human groups analysed show high levels of inter-group variability. In addition, results show that Amerindian populations living in the Piedmont are genetically more related to those in the Andean than in the Amazonian populations.

Keywords: *mtDNA, sequence DNA polymorphism, native Americans, new world*

Introduction

In recent years the number of genetic studies among Native Americans has constantly increased. Most of these studies have focused on various aspects of the peopling of the Americas: time of entry into the New World, number and principal migration routes, and the source of this peopling. Despite the efforts to characterize the American peopling, the knowledge of this process in areas like the Andean–Amazonian boundary is still full of uncertainties. There is a lack of detailed knowledge of the demographic events that took place in the region during pre-Columbian times and there are also few archaeological and genetic data available. The present study focuses on the mitochondrial DNA (mtDNA) diversity of some Amerindian populations living in the Piedmont area of the Beni Department (Bolivia): Aymara, Quechua, Chimane and Moseten.

The Piedmont is the transition zone between the eastern valleys of the Oriental Andean chain (called ‘Yungas’) and the tropical Amazonian plains (called ‘Llanos de Moxos’) and is formed by parallel hills, NW–SE orientated, ranging from 250 to 2500 m in height (Figure 1). The predominant ecosystem is tropical forest shifting to sub-tropical, with a higher influence of Amazonian than Andean in its composition. The area, inhabited at present by the Chimane and Moseten, overlaps with the highland territories where Quechua and Aymara populations have traditionally settled.

The peopling process and the genetic pool of the Andean and Amazonian area have been considered using mtDNA and Y chromosome by several authors, including different interpretations of the process and form of both cited aspects.

Despite some controversy, it seems clear that during the peopling process all ecological strata were quickly occupied, from the Andean mountains to the coastal environments and tropical forests. The importance of the high Andean plateau (‘altiplano’) as a North–South American corridor seems to be plausible (Salzano and Callegari-Jacques 1988) but the pathways across the tropical forest are far from being verified (Lynch 1983). Rothhammer et al. (2001), using a genetic distance analysis between Andean and Amazonian populations, have suggested the existence of two main migratory movements into South America in late Pleistocene: one moved southward into the Andean areas, east of Brazil and the Argentine Pampas and the second went eastwards from Venezuela and later the Brazilian Amazon, finally arriving at the eastern slopes of the Andes 3500 years ago using available waterways of the Amazonian river tributaries. Rothhammer et al. (2001) believe that present day Andean natives are descendants of those Amazonian groups. Likewise, ancient mtDNA studies have pointed out a relationship between the prehistoric groups of the Azapa valley in northern Chile and the Andean and Amazonian populations, suggesting an Amazonian origin of the Andean groups (Moraga et al. 2001).

The occupation of the Andean zone has led to a cultural and linguistic homogeneity of the populations living there. There is some debate over when the Andean plateau was first colonized by humans. MacNeish (1971) believes that the archaeological evidence supports

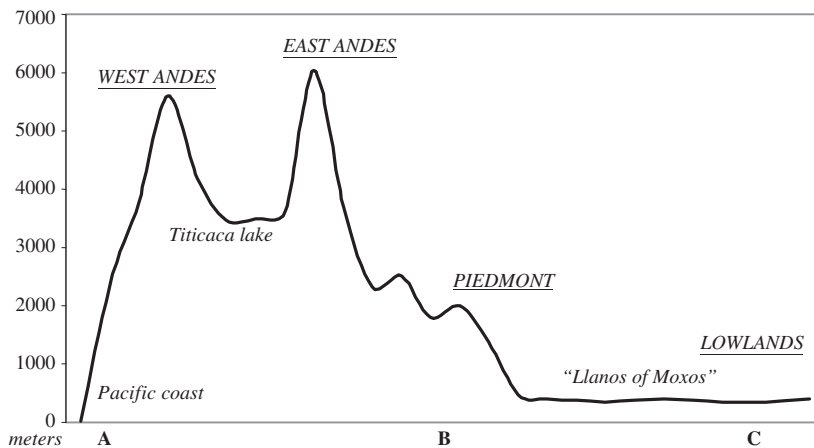
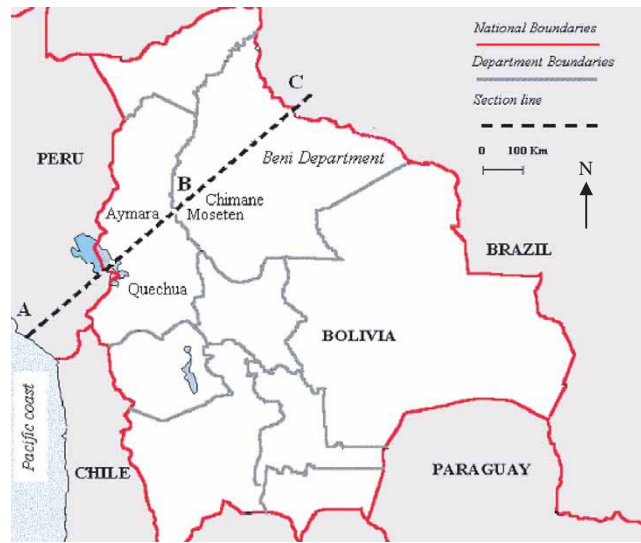


Figure 1. Altitudinal cross-section from the highlands to the lowlands showing the location of the Piedmont in the Beni Department of Bolivia and the populations reported in the present study.

occupation as far back as 22 000 years ago; however, other researchers are sceptical of both the dating and the artefacts on which these claims are based. On the basis of less contentious evidence, Lynch (1990) suggests that 12 000 years ago seems to be a reasonable estimate of the earliest substantial human activity on the Andean plateau. In contrast, the Amazonian region might have been sparsely populated (Steward 1944–1949; Denevan 1966), with human populations concentrating on the Brazilian coast, in the great Amazonian rivers, and in the Beni savannas of Bolivia, where subsistence resorts and river transportation systems in the lowlands allowed for a moderate population growth (Denevan 1966).

Some evidence shows that the Piedmont area, between the tropical forest and the Andes, has been occupied by distinct human groups since pre-ceramic periods, giving origin to the populations which presently live in this area. The present article tries to contribute to and review the knowledge of this area, helping to elucidate its human peopling and to clarify the

genetic contribution and migration dynamics of the populations implicated in the human history of the Andean–Amazonian border.

The Piedmont-living populations

Four distinct ethnic Amerindian populations inhabit the Piedmont region within the Beni Department in Bolivia: Chimane, Mosenen, Aymara and Quechua.

A population of around 4000 Chimane (Díez Astete and Murillo 1998) is distributed at present along several upstream rivers in the Beni area. In the last two centuries the distribution of this ethnic group has not changed along the upstream rivers and tributaries of the Beni River. The first Chimane historical record dates from 1621 when the Franciscan Gregorio de Bolívar arrived in the Chimane territory (Chicchón 1992). In 1693 the Jesuits founded the mission of San Francisco de Borja near the River Maniquí in order to convert the Indians in the surrounding area to Catholicism (D'Orbigny 1944; Vargas Ugarte 1964; Altamirano 1979). One century later, the Redentorists founded the mission of Cara Cara by the Maniquí riverside, which is nowadays known as Fátima de Chimane (Riester 1993).

The traditional Chimane settlement is formed of a few independent houses where nuclear families live. The Chimane were semi-nomad groups, moving seasonally following natural resources and building more stable villages only in highland territories, protected from floods. The Chimane economic system is based mainly on small animal hunting, fishing and an agricultural system called 'roza-tumba-quema'.

The Mosenen population, estimated around 1300 (Díez Astete and Murillo 1998), live in Alto Beni, on the Andean hills. Their reduced size causes high genetic consanguinity. Mosenen settlements move frequently from one place to another, mainly because of depletion of land productivity, practising subsistence agriculture of rice, yuca, and cocoa, as well as fishing, hunting and gathering, activities greatly affected by indiscriminate wood extraction and forest destruction. Franciscans reduced the Mosenen populations in 1790 at San Francisco de Mosenen and in 1804 at San Miguel de Muchanes. Other settlements are Santa Ana and Covendo missions (Chicchón 1992). The sociolinguistic situations of the speakers of Mosenen and Chimane are very different. Mosenen of Covendo has around 600 speakers and Mosenen of Santa Ana has between 150 and 200 speakers. Chimane, on the other hand, is still spoken by at least 4000 people (Sakel 2004). Only a small number of older people speak Mosenen with very little Spanish influence. The Mosenen and Chimane languages are closely related and grouped as 'Mosenenean' clustered in the Macro-Panoan languages family of the Ge-Pano stock.

Quechua-speaking people constitute the main population in the Andean region, and their language, along with the Maya and Guarani, is one of the three most spoken native languages in America. Quechua is spoken in seven countries, and at present it cannot be considered an exclusively Andean language since it is also widely used in the Amazonian region. Quechua speakers include 4.4 million inhabitants in Peru (19% of total speakers), 2.2 million in Ecuador (23%), 1.6 million in Bolivia (25%), 0.12 million in Argentina, and over 5000 speakers in Colombia, Brazil and Chile (Cerrón-Palomino 1987). The Quechua language is formed of two groups of dialects named Quechua I and Quechua II; the first is spoken in the central Andean region and the second one in the north and south of the Andean region.

A population of around 2.2 million Aymara live in Bolivia and Peru today, particularly around Lake Titicaca and most of them speak the Aymara language. The Aymara and Quechua languages belong to the Andean family stock. The origin and the relationship of

these groups are uncertain. The most likely theory refers to a common origin somewhere on the south-central Peruvian coast.

The analyses reported here complete those initiated in the Beni Department in Bolivia (Bert et al. 2004) and may serve to shed light on the influence of highland populations in the colonization of Amazonia, defining the relationship between the lowland populations and those with influence from higher altitude populations, including the Chimane, Moseten, Aymara and Quechua.

Methods

DNA was extracted from pulled-out hairs, with their root bulbs preserved, and finally studied in a sample of 46 unrelated individuals. Hair samples were collected in several settlements: Fátima de Chimane, Santa Ana de Mosetenes, Yucumo, Totaizal, San Borja and Palos Blancos within the Piedmont area, in the Beni Department, and stored in sterile tubes until analysed in the laboratory. The collection procedure of samples was in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, reviewed in 1983. All surveyed individuals gave their consent. Strong selection criteria were applied to the individuals considered. Their family relationships and ethnicity were determined *in situ* by a demographic survey performed simultaneously with the sampling. Ethnicity was assigned to individuals based on self-identification during the interview by asking them about their name, birthplace, language, and family affiliation. Only unrelated individuals were studied.

DNA extraction was performed using ChelexTM 100, as described in Walsh et al. (1991). A 401-bp DNA fragment from the Control Region of the hypervariable segment I (HVSI) of the mtDNA molecule was analysed, from bp 16 000 to bp 16 400. The double-stranded DNA fragments were amplified by PCR using primers L-15978 (5'-CTACGCCAATCACTTTATTG-3') and H-16 412 (5'-GTGCGGGATATTGATTCAC-3'), following a standard PCR protocol with 34 cycles including denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 54°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. After purification of PCR products with MicrospinTM S-300 HR columns (Pharmacia, Biotech) both DNA strands were directly sequenced separately in an asymmetric PCR, using primers L-15995 (5'-AATTCTCACCCCTAGCTCC-3') and H-16402 (5'-TGATTTACGGAGGATGGT-3') and following the standard protocol recommended for automatic direct sequencing by the kit manufacturer (Dye-Terminator 2, Perkin-Elmer): 34 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 60°C for 30 s. Sequence PCR purification was done by salt/ethanol precipitation and the final product was run in an automatic ABI PRISM 3700 sequencer at the Serveis Científico-Tècnics (SCT) of the University of Barcelona.

Two sets of sequence analyses were made for each population: one using the whole 401-bp mtDNA fragment obtained, and the other with a shorter fragment of 328 bp, coincident with that most frequently used in the literature, for comparison with other South Amerindian populations. Sequences were aligned and compared with the Cambridge Reference Sequence (Anderson et al. 1981) using CLUSTAL V software (Higgins et al. 1992). In both analyses, variation between positions 16 182–16 186 and length polymorphism at the homopolymeric cytosine stretch were not considered. The Bolivian individuals

studied had been previously assigned to the four major haplogroups found in Native Americans (A, B, C, D) using RFLP characterization (Bert et al. 2001).

Sequence mismatch distributions were analysed for the large mtDNA fragment of 401 bp. Mean pairwise sequence differences were calculated using the ARLEQUIN 2001 package (Schneider et al. 2000) for each population. The phylogenetic relationships among sequences were studied using a Median Network distribution obtained with NETWORK 3.0.1.2 alpha version (Bandelt et al. 1999).

In the second set of analyses the shorter 328 bp fragment (bp 16 056 to bp 16 383) was compared with mtDNA sequences from other Native Americans. Several molecular diversity indexes were calculated using the ARLEQUIN 2001 package (Schneider et al. 2000). Gene diversity was estimated using Nei's (1987) index. To test the neutral mutation hypothesis, which considers the populations to be panmictic and in genetic equilibrium, we computed the F_S statistic (Fu 1997). In order to compare the within-population variability in these groups θ_K (Ewens 1972) was also analysed. The phylogenetic neighbour-joining tree was inferred using the PHYLIP software (Felsenstein 1993).

In order to determine the proportion of intra- and inter-genetic variation due to differences in the Piedmont and 'Llanos' populations in the whole Amerindian context and try to find the affinity grade with the Andean or Amazonian populations analyses of molecular variance (AMOVA) was performed using the ARLEQUIN 2001 package (Schneider et al. 2000). We used mtDNA haplogroup frequency data of the Beni Department populations: Aymara, Quechua, Chimane, Moseten, Ignaciano, Trinitario, Yuracare and Movima (Bert et al. 2001) adding representative mtDNA haplogroup frequencies of other South-Amerindian populations (Table VI).

A principal component analysis of the mtDNA haplogroups was performed using the program XLSTAT (7.5.2) (Fahmy 1995) with all the populations mentioned previously.

Results

Control region sequence variation

A total of 46 mtDNA sequences were analysed for mtDNA, HVSI sequence diversity, 26 of them belonging to Andean populations and 20 belonging to Mosetenean groups. Table I shows the sequence polymorphisms of the 46 new sequences reported, sorted by the Native American haplogroups and ethnic affiliation. The sequences obtained are representative of 21 different HVSI mtDNA lineages, defined by 37 variable nucleotide positions. It was found that 66.7% of the lineages were single sequences. Nine individuals of the 46 studied (19.6%) belong to haplogroup A, all of them exhibiting the transitions 16 223 T → C and 16 319 G → A with frequent transitions at position 16 189 and 16 290 bp. A total of 32 sequences (69.5%) belong to haplogroup B, all showing the transitions 16 189 T → C and 16 217 T → C. The transition 16 188 C → T is only present in some Andean lineages. Only one sequence belonged to haplogroup C with the characteristic 16 223, 16 298, 16 325 T → C transitions, as well as the 16 327 C → T one. Three sequences (6.5%) were grouped into haplogroup D, two of them including transitions 16 223, 16 292, 16 294 C → T, 16 241 A → G, 16 271, 16 342, and 16 362 T → C. One sample (Chimane 150) could not be affiliated to any known haplogroup and it has been classified to belong to 'others', showing transitions 16 287 C → T and 16 311 T → C.

Table I. Polymorphic nucleotides sites of 46 mtDNA new sequences reported in this study.

Population	Sample ID	Lineage	CRS*																										
			A	T	T	C	T	C	A	A	C	C	T	G	C	C	T	C	T	G	C	T	C	T	T	C	T	T	
HAPLOGROUP A																													
Quechua	545	Aa
Moseten	036	
Moseten	039	Ab
Chimane	151	
Moseten	031	Ag
Chimane	230	
Chimane	149	Ak
Chimane	152	
Chimane	048	Aj
HAPLOGROUP B																													
Aymara	257	
Aymara	289	
Moseten	036	
Chimane	244	
Aymara	244	
Aymara	249	Bc
Aymara	255	
Chimane	136	
Chimane	153	
Chimane	353	
Aymara	558	
Quechua	533	
Moseten	029	
Moseten	046	Bk
Chimane	181	
Moseten	032	Bl
Moseten	035	Bm
Moseten	167	Bn
Chimane	167	Bo
Chimane	247	Bq
Aymara	248	Bf
Aymara	248	Bf
Aymara	530	Bt
Quechua	530	
Aymara	243	
Quechua	532	
Quechua	534	
Quechua	536	
Quechua	537	Bu
Quechua	542	
Quechua	544	
Quechua	546	
Quechua	549	
Quechua	539	Bw
Quechua	540	Bx
Quechua	540	Bx
Quechua	543	Bv
HAPLOGROUP C																													
Moseten	037	Ch
HAPLOGROUP D																													
Aymara	268	Db
Quechua	531	Dc
Quechua	535	
Other haplogroups																													
Chimane	150	Ob

Median-joining network

Figure 2 shows the relationships among the sequences analysed in a median-network plot. This median network provides a graphical representation of the relationship between the 46 mtDNA sequences obtained and the 54 mtDNA sequences studied in a previous work (Bert et al. 2004). Almost all sequences clustered together by haplogroup. Identical haplotypes were found in Beni populations as well as in other Central and South Amerindian groups. These multiethnic nodes were indicated in Figure 2. Haplogroup D sequences include one Aymara and two Quechua, and forms a distinct branch in the network. The Aymara 268 sequence presents the unique C → T transition at bp 16 320, and the two Quechua samples 531 and 535 are in the extreme of the D branch, showing the characteristic D mutations and some singular substitutions. The A haplogroup branch initiates with samples that do not have the 16 362 T → C transition: Chimane 149A, which has 16 264 C → T transition, and individuals Mosenen 31 and Chimane 230, who have a C → T transition at bp 16 290. The B branch, including a T → C transition at 16 189 and

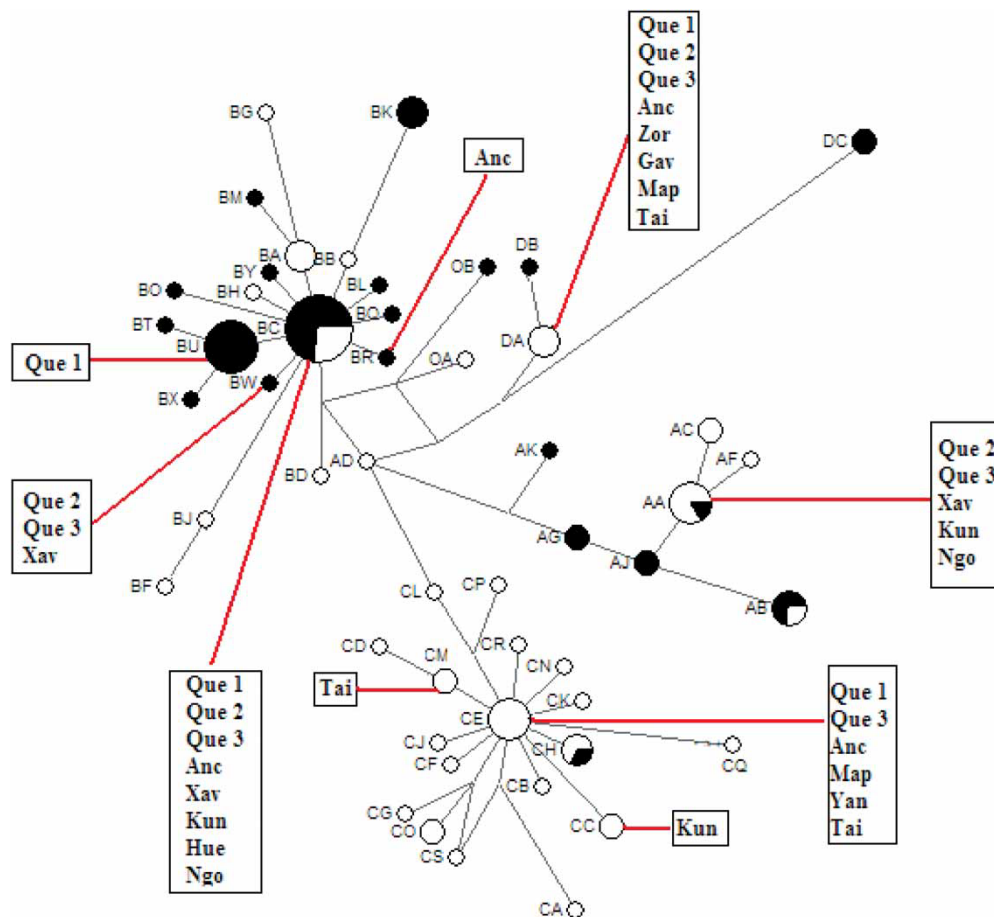


Figure 2. Median-joining network plot showing the 46 new sequences reported in this study (in black) and the other Bolivian sequences studied before by the authors. Haplotypes shared with other Central and South American populations are indicated.

Ann Hum Biol Downloaded from informahealthcare.com by Joaquin Ibanez Esteb on 12/07/10
For personal use only.

Table II. Sequence diversity parameters for the Beni populations (Piedmont and 'Llanos') compared with other Amerindians.

	Population	Linguistic affiliation	n	K	S	% single lineages	% private lineages	h ± SD	Mean pairwise differences	π ± SD
Piedmont Beni	Aymara Beni	Andean	10	5	9	80.0	40.0	0.67 ± 0.16	1.800 ± 0.606	0.0065 ± 0.0045
	Quechua Beni		16	8	18	75.0	50.0	0.76 ± 0.11	4.075 ± 1.057	0.0160 ± 0.0092
	Total Andean Beni*		26	11	22	72.7	54.5	0.82 ± 0.06	3.323 ± 0.852	0.0126 ± 0.0073
	Chimane	Macro-Panoan	10	8	16	87.5	37.5	0.93 ± 0.08	5.133 ± 1.431	0.0187 ± 0.0110
	Moseten		10	8	18	75.0	25.0	0.96 ± 0.06	6.356 ± 1.556	0.0240 ± 0.0138
	Total Mosetenean†		20	11	22	54.6	72.7	0.93 ± 0.03	5.532 ± 1.390	0.0206 ± 0.0113
	Total Piedmont Beni¶		46	21	36	66.7	66.7	0.90 ± 0.03	4.662 ± 0.968	0.0174 ± 0.0094
	Ignaciano	Equatorial (Arawakan)	15	11	21	81.8	45.5	0.93 ± 0.05	5.924 ± 1.443	0.0226 ± 0.0126
	Trinitario		12	11	21	90.9	72.7	0.98 ± 0.04	6.394 ± 1.436	0.0243 ± 0.0137
	Total Moxos‡		27	20	29	85.0	60.0	0.96 ± 0.03	6.006 ± 1.359	0.0228 ± 0.0123
'Llanos' Beni	Yuracare	Equatorial	15	10	20	60.0	70.0	0.94 ± 0.04	6.076 ± 1.466	0.0227 ± 0.0126
	Movima	Tucanoan	12	8	12	75.0	50.0	0.89 ± 0.08	2.939 ± 0.936	0.0103 ± 0.0064
	Total 'Llanos' Beni**	Equatorial-Tucanoan	54	34	38	71.0	80.6	0.96 ± 0.02	5.521 ± 1.276	0.0221 ± 0.0117
	Quechua Arequipa	Andean	22	18	24	83.3	55.6	0.98 ± 0.02	4.957 ± 1.170	0.0185 ± 0.0102
	Quechua Tayacaja		61	41	47	78.0	70.7	0.97 ± 0.01	5.915 ± 1.349	0.0220 ± 0.0116
	Quechua/Nimatsinguenga		22	15	22	80.0	60.0	0.94 ± 0.04	5.143 ± 1.369	0.0189 ± 0.0104
	Total Quechua Peru§		105	63	58	78.1	81.0	0.97 ± 0.01	5.683 ± 1.233	0.0211 ± 0.0111
	Ancash		33	27	39	88.9	77.8	0.98 ± 0.01	6.053 ± 1.395	0.0213 ± 0.0115
	Zoro	Equatorial (Tupi)	29	8	16	37.5	25.0	0.76 ± 0.07	3.833 ± 1.020	0.0139 ± 0.0078
	Gaviao	Macro-Ge	28	7	16	14.3	28.6	0.86 ± 0.03	4.212 ± 1.120	0.0152 ± 0.0085
Other Amerindians	Xavante		25	4	10	25.0	25.0	0.68 ± 0.05	3.000 ± 0.994	0.0108 ± 0.0063
	Mapuche	Andean	39	12	19	33.3	58.3	0.90 ± 0.02	5.119 ± 1.430	0.0179 ± 0.0097
	Yanomama	Chibchan	50	18	22	61.1	94.4	0.84 ± 0.05	3.554 ± 0.868	0.0108 ± 0.0062
	Taino	Equatorial (Arawakan)	19	11	13	63.6	54.5	0.92 ± 0.04	2.854 ± 0.891	0.0097 ± 0.0059
	Kuna	Chibchan	63	7	10	42.9	28.6	0.59 ± 0.06	3.295 ± 1.209	0.0120 ± 0.0068
	Huetar		27	7	11	57.1	57.1	0.71 ± 0.07	3.293 ± 1.165	0.0117 ± 0.0068
	Ngobe		46	6	11	33.3	50.0	0.62 ± 0.06	3.766 ± 1.294	0.0141 ± 0.0078

n, number of individuals; K, number of different lineages; S, number of polymorphic sites; h_s, gene diversity; π , nucleotide diversity.

*Andean Beni = Aymara Beni + Quechua Beni.

†Mosetenean = Chimane + Moseteri.

‡Moxos = Ignaciano + Trinitario.

§Quechua Peru = Quechua Arequipa + Quechua Tayacaja + Quechua/Nimatsinguenga.

¶Piedmont Beni = Andean groups Beni + Mosetenean groups.

**'Llanos' Beni = Ignaciano + Trinitario + Yuracare + Movima.

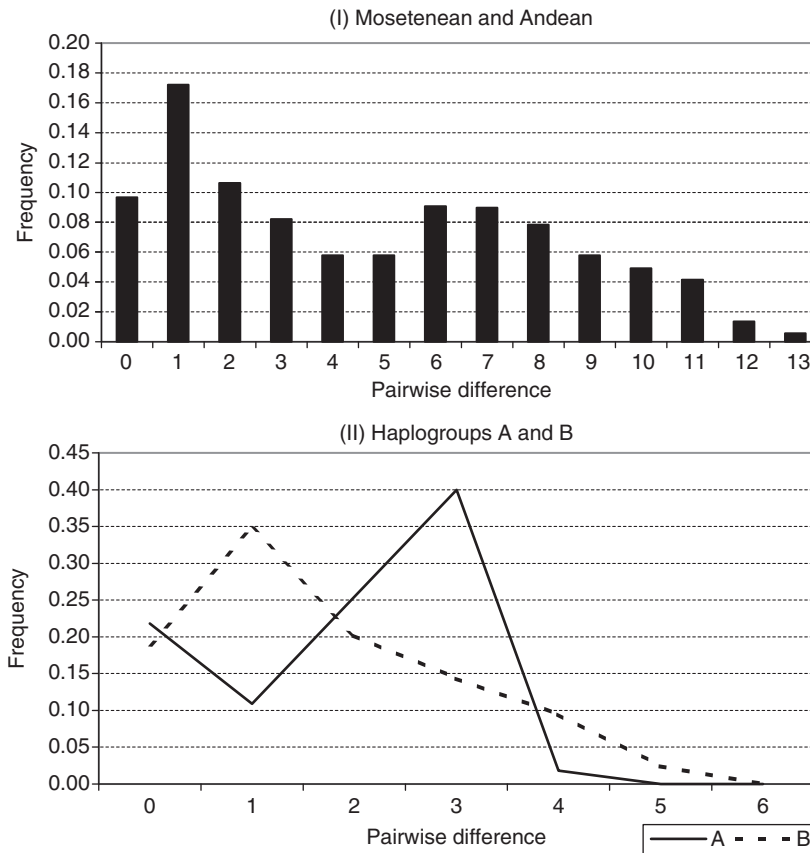


Figure 3. Pairwise mismatch distributions: (I) ensemble of four populations reported, (II) for haplogroups A and B in all four populations.

16 217, consists of two centres, one formed by Moseten, Chimane and Aymara samples and the other constituted exclusively by Quechua individuals. This branch has a radial morphology, Forster et al. (1996) consider these star-shaped phylogenies to be indicative of population expansions.

Pairwise difference distribution

The mismatch distribution of whole populations (Figure 3) shows a bimodal pattern with a major peak at one difference and smaller one at seven differences. The average number of pairwise differences is 4.66 ± 0.97 .

The samples were also analysed using linguistic criteria in two new mismatch distributions (graphic not shown). In the first one, Mosetenean Pano speakers show an average pairwise difference of 5.53 ± 1.39 . In the second pairwise distribution, Aymara and Quechua Andean speakers, the mean pairwise difference is 3.32 ± 0.86 .

When haplogroups A and B are considered separately, the mismatch distribution of the Piedmont (Andean and Mosetenean together) is unimodal in both cases, for haplogroup A,

Table III. Values for θ statistics and F_S neutrality test in Amerindian populations, sorted in order of θ_K value.

Population	θ_K (95% CI)	F_S	P
Ancash	67.03 (31.02–153.76)	–20.11	<0.000
Total Quechua Perú	65.58 (44.34–97.38)	–25.25	<0.000
Trinitario	58.45 (14.44–252.37)	–4.46	0.013
Quechua Tayacaja	53.61 (32.02–91.00)	–25.29	<0.000
Quechua Arequipa	43.88 (17.64–117.36)	–10.89	<0.000
Total ‘Llanos’ Beni	38.36 (22.43–66.25)	–21.35	<0.000
Total Moxos	33.31 (15.40–75.07)	–9.41	<0.000
Quechua/Nmatsinguenga	19.52 (8.65–45.37)	–5.41	0.007
Ignaciano	17.06 (6.4–47.83)	–2.66	0.092
Moseten	16.40 (4.89–59.01)	–1.36	0.177
Chimane	16.40 (4.89–59.01)	–1.92	0.123
Total Piedmont Beni	14.35 (8.00–25.52)	–7.29	0.012
Yuracare	11.94 (4.62–31.87)	–1.48	0.222
Taino	10.05 (4.29–23.67)	–4.41	0.012
Movima	9.32 (3.29–27.26)	–2.63	0.046
Total Mosetenean	9.25 (4.02–21.30)	–1.35	0.279
Yanomama	7.74 (4.19–13.99)	–4.77	0.039
Total Andean Beni	6.66 (3.08–14.11)	–2.32	0.129
Quechua Beni	5.70 (2.26–14.23)	–0.56	0.360
Mapuche	5.54 (2.75–10.80)	–0.21	0.494
Aymara Beni	3.30 (1.07–10.05)	–0.84	0.222
Zoro	3.30 (1.44–7.23)	0.85	0.689
Huetar	2.73 (1.13–6.22)	0.97	0.709
Gaviao	2.67 (1.11–6.06)	1.97	0.821
Kuna	1.81 (0.79–3.86)	2.78	0.881
Ngobe	1.62 (0.66–3.68)	3.79	0.921
Xavante	1.08 (0.36–2.96)	3.72	0.946

with one peak at three differences and an average number of pairwise differences of 1.89 ± 0.79 ; for haplogroup B, with a peak at one difference with a mean pairwise difference of 1.68 ± 0.69 .

Genetic diversity analyses

The genetic diversity parameters have been calculated for all the studied populations using the small 328 bp fragment (bp 16 056–16 383) (Table III) to allow direct comparisons with other Amerindian populations. The lowest nucleotide diversity was 0.0065 found in the Aymara sample, and the highest one was 0.0243 in the Trinitario and 0.0240 in Moseten populations. The same results are obtained when the mean pairwise differences are analysed: Aymara 1.80, Trinitario 6.39 and Moseten 6.36. If the gene diversity is considered, the lowest values are found in Central American populations (Kuna, 0.59) whereas the Quechua Arequipa population present the highest value (0.98). In Beni area the Andean groups shows lower values.

Table IV shows the variability estimator θ_K used to compare the amount of within-group diversity in the studied populations. The results are sorted by θ_K (a statistic based on the number of observed alleles), which best reflects the changes in a small number of generations. Under this criterion, the highest values are found in the Quechua groups of Peru (65.58) and particularly in Ancash population (67.03); the whole populations living in

Table IV. Genetic distance matrix values obtained using Tamura and Nei (1993) distance among the studied populations and other Amerindian populations.

	Yur.	Ign.	Mov.	Tri.	Aym.	Que.	Chi.	Mos.	Q. Ar.	Q. Ta.	Q. Nm.	Anc.	Zor.	Gav.	Xav.	Map.	Yan.	Tai.	Kun	Hue	Ngo	
Yuracare.	0.132																					
Ignaciano	0.276	0.044																				
Movima	0.119	-0.046	0.033																			
Trinitario	0.286	0.324	0.598	0.297																		
Aymara	0.286	0.315	0.504	0.295	0.035																	
Quechua	0.189	0.180	0.453	0.182	0.113	0.123																
Chimane	0.166	0.142	0.385	0.152	0.127	0.145	-0.080															
Moseten	0.175	0.172	0.344	0.147	-0.009	0.028	0.044	0.054														
Quechua Arequipa	0.141	0.032	0.179	0.052	0.162	0.192	0.090	0.077	0.076													
Quechua Tayacaja	0.162	0.114	0.302	0.106	0.086	0.125	0.059	0.061	0.012	0.008												
Quechua/Nimatsing.	0.136	0.072	0.205	0.057	0.066	0.125	0.069	0.064	0.011	0.014	-0.013											
Ancash	0.294	0.093	0.263	0.155	0.504	0.463	0.367	0.316	0.327	0.092	0.221	0.194										
Zoro	0.274	0.137	0.311	0.190	0.390	0.368	0.269	0.227	0.238	0.059	0.137	0.131	0.053									
Gaviao	0.305	0.345	0.563	0.328	0.063	0.113	0.100	0.117	0.052	0.183	0.125	0.127	0.485	0.400								
Xavante	0.123	0.044	0.170	0.044	0.165	0.197	0.119	0.106	0.071	0.007	0.024	0.010	0.144	0.106	0.206							
Mapuche	0.334	0.112	0.019	0.079	0.520	0.511	0.482	0.450	0.371	0.218	0.326	0.244	0.260	0.325	0.536	0.209						
Yanomama	0.350	0.103	0.011	0.098	0.642	0.570	0.530	0.474	0.420	0.226	0.367	0.279	0.279	0.351	0.614	0.232	0.060					
Taino	0.390	0.296	0.525	0.340	0.476	0.440	0.296	0.270	0.353	0.188	0.281	0.282	0.326	0.313	0.435	0.248	0.517	0.545				
Kuna	0.378	0.282	0.544	0.357	0.597	0.530	0.369	0.319	0.434	0.217	0.348	0.339	0.267	0.285	0.547	0.300	0.532	0.561	0.140			
Huetar	0.188	0.310	0.522	0.357	0.496	0.464	0.309	0.281	0.381	0.237	0.317	0.316	0.348	0.339	0.462	0.288	0.526	0.551	0.295	0.203		
Ngobe																						

the ‘Llanos of Beni’ have a value of 38.36 while the Andean Beni populations exhibit a value of 6.66. The F_S value tests the hypothesis of selective neutrality and population equilibrium. This statistic tends to give large negative values when demographic expansions have occurred. All the Piedmont populations show negative values.

Phylogenetic analyses

To compare the Beni Piedmont and Llanos Bolivian sequences with a representative Central and South Amerindians sample 346 sequences, including the samples studied here, were analysed. These include the Mapuche (Ginther et al. 1993), the Zoro, Gaviao, and Xavante (Ward et al. 1996), the Ngobe (Kolman et al. 1995), the Kuna (Batista et al. 1995), the Huetar (Santos et al. 1994), the Quechua Arequipa, Quechua Tayacaja, Quechua/Nmatsinguenga (Fuselli et al. 2003), the Ancash (Lewis et al. 2004), Yanomama (Torroni et al. 1993) and Taino (Lalueza et al. 2001).

Table IV shows the genetic distance matrix values obtained using the Tamura and Nei (1993) distance among the studied populations. These values were used to generate a neighbour-joining tree (Figure 4). Three major clusters are observed. One consists of

Ann Hum Biol Downloaded from informahealthcare.com by Joaquin Ibanez Esteb on 12/07/10
For personal use only.

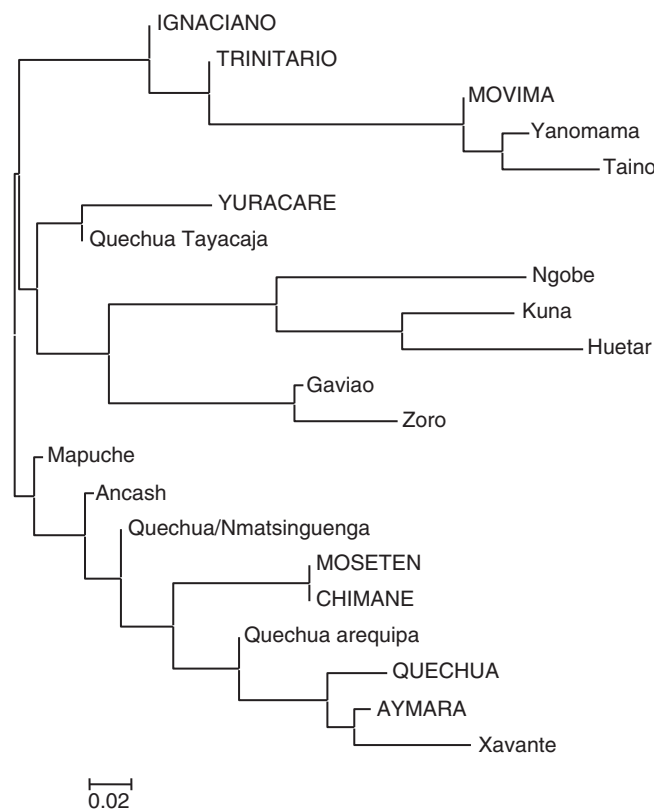


Figure 4. Neighbour-joining tree based on Tamura-Nei distance of sequences of the Beni populations studied by the authors and other Amerindian groups.

Table V. Number of shared lineages among Beni populations and other Central and South Amerindians groups.

	Aymara Beni	Quechua Beni	Chimane	Moseten	Ignaciano	Trinitario	Yuracare	Movima
Aymara Beni								
Quechua Beni	2							
Chimane	1	1						
Moseten	1	1	5					
Ignaciano	1	2	2	3				
Trinitario	0	1	0	1	2			
Yuracare	1	2	1	1	3	1		
Movima	1	1	1	2	4	1	1	
Quechua Arequipa	3	2	1	2	3	1	1	3
Quechua Tayacaja	1	3	1	2	4	2	2	3
Quechua/Nmatsinguenga	1	3	1	1	3	1	2	2
Ancash	2	1	1	2	3	1	1	3
Zoro	0	0	0	0	1	0	0	1
Gaviao	0	0	0	0	1	0	0	1
Xavante	1	3	1	1	2	1	2	1
Mapuche	0	0	0	1	2	1	0	2
Yanomama	0	0	0	1	1	1	0	1
Taino	0	0	0	1	2	2	0	2
Kuna	1	2	1	1	2	1	2	1
Huetar	1	1	1	1	1	0	1	1
Ngobe	1	2	1	1	2	1	2	1

Central Amerindians and Tupi-speaking populations, while the other two differentiate the populations living in the Amazonian influence region from those in the Andean and Piedmont ones, with the exceptions of the Yuracare and Quechua-Tayacaja that join in Central America cluster and the Xavante, Amazonian population that remained related to the Andean branch. Linguistic proximity is a criterion that joins populations in the tree.

Table V summarizes the number of shared lineages among the Beni populations and the previous cited groups. The number of private haplotypes found in the Beni populations ranges from 25% in Moseten to 72.7% in Trinitario. These frequencies are not uncommon in Amerindian populations, such Zoro, Xavante (25%), Quechua Arequipa (79.5%), and Ancash (88.9%). Haplotypes like Aa, Bc, Ce and Da are present in geographic and linguistic distinct populations from the continent.

Principal component analyses

Table VI reports the frequency of the four mtDNA haplogroups in the populations typed by Bert et al. (2001) and other Central and South Amerindian populations examined by other authors. Comparative studies in aboriginal populations of America show that the four main Native American mtDNA haplogroups are widely distributed in South Amerindian populations, with some exceptions such as the extinct Fuego-Patagonian (Lalueza et al. 1997; García-Bour et al. 2004) that lack haplogroups A and B.

A principal component analyses (PCA) was performed with these data and results are presented in Figure 5. The first principal component is responsible for the 45.3% of variance and the distribution of the populations along this first principal component basically

Ann Hum Biol Downloaded from informahealthcare.com by Joaquin Ibanez Esteb on 12/07/10
For personal use only.

Table VI. mtDNA haplogroup frequencies of the Beni Department populations (abbreviations in upper case letters) and other representative South Amerindian ethnic groups (abbreviations in lower case letters).

Ethnic group	Abbrev.	Linguistic family	n	A	B	C	D	Author
Ache	ach	Equatorial-Tucanoan	63	0.095	0.905	0	0	Schmitt et al. (2004)
Ancash	anc	Andean	33	0.091	0.515	0.182	0.212	Lewis et al. (2004)
Atacama-A	ata1	Chibcha-Paezan	13	0.231	0.692	0.077	0	Baillet et al. (1994)
Atacama-B	ata2	Chibcha-Paezan	24	0.083	0.625	0.25	0.042	Rocco et al. (2001)
Atacameño	ata3	Chibcha-Paezan	50	0.12	0.72	0.1	0.06	Merriwether et al. (1995)
Aymara-Beni	AYM1	Andean	33	0	0.94	0.03	0.03	Bert et al. (2001)
Aymara-2(Chile)	aym2	Andean	120	0.075	0.567	0.183	0.158	Rocco et al. (2001)
Aymara-3	aym3	Andean	172	0.064	0.674	0.122	0.14	Merriwether et al. (1995)
Ayoreo	ayo	Equatorial-Tucanoan	91	0	0	0.835	0.165	Dornelles et al. (2004)
Azapa	aza	Unknown	32	0.313	0.219	0.313	0.031	Rothhammer et al. (2003)
Boruca	bor	Chibcha-Paezan	14	0.214	0.715	0	0.071	Torroni et al. (1993)
Bribri/Cabecar	bri	Chibcha-Paezan	24	0.542	0.458	0	0	Torroni et al. (1993)
Cayapa	cay	Chibcha-Paezan	30	0.333	0.2	0.167	0.3	Rickards et al. (1999)
Chimane	CHI	Ge-Pano-Carib	41	0.39	0.537	0.049	0	Bert et al. (2001)
Cinta Larga	cin	Equatorial-Tucanoan	17	0.059	0	0.235	0.647	Lobato da Silva et al. (2001)
Embera	emb	Chibcha-Paezan	22	0.73	0.23	0	0	Mesa et al. (2000)
Queguino	fue	Andean	58	0	0	0.396	0.586	Lalueza et al. (1997)
Gaviao	gav	Equatorial-Tucanoan	27	0.148	0.148	0	0.704	Ward et al. (1996)
Guatasa	guat	Chibcha-Paezan	20	0.85	0.15	0	0	Torroni et al. (1994)
Guaymi	guay	Chibcha-Paezan	16	0.688	0.312	0	0	Torroni et al. (1993)
Huetar	hue	Chibcha-Paezan	27	0.704	0.037	0	0.259	Santos et al. (1994)
Huilliche	hui	Andean	80	0.037	0.288	0.187	0.488	Merriwether et al. (1995)
Ignaciano	IGN	Equatorial-Tucanoan	22	0.182	0.364	0.409	0	Bert et al. (2001)
Ingano	ing	Andean	27	0.15	0.44	0.37	0	Mesa et al. (2000)
Kraho	kra	Ge-Pano-Carib	14	0.286	0.571	0.143	0	Torroni et al. (1993)
Kuna	kun	Chibcha-Paezan	63	0.714	0.286	0	0	Batista et al. (1995)
Macushi	mac	Ge-Pano-Carib	10	0.1	0.2	0.3	0.4	Torroni et al. (1993)
Makiritare	mak	Ge-Pano-Carib	10	0.2	0	0.7	0.1	Torroni et al. (1993)
Mapuche-A	map1	Andean	111	0	0.072	0.441	0.486	Moraga et al. (2000)
Mapuche-B	map2	Andean	58	0.052	0.31	0.207	0.293	Baillet et al. (1994)
Marubo	mar	Ge-Pano-Carib	10	0.1	0	0.6	0.3	Torroni et al. (1993)
Mataco	mat	Ge-Pano-Carib	28	0.107	0.357	0	0.536	Torroni et al. (1993)
Moseten	MOS	Ge-Pano-Carib	20	0.4	0.55	0	0	Bert et al. (2001)

(continued)



Table VI. Continued.

Ethnic group	Abbrev.	Linguistic family	n	A	B	C	D	Author
Movina	MOV	Equatorial-Tucanoan	22	0.091	0.091	0.636	0.182	Bert et al. (2001)
Ngobe	ngo	Chibcha-Paezan	46	0.674	0.326	0	0	Kolman et al. (1995)
Parakana	par	Equatorial-Tucanoan	12	0.083	0.25	0.417	0.25	Lobato da Silva et al. (2001)
Pehuenche-Mo	peh1	Andean	105	0.029	0.105	0.41	0.457	Moraga et al. (2000)
Pehuenche-Me	peh2	Andean	100	0.02	0.09	0.37	0.52	Merriwether et al. (1995)
Piaroa	pia	Equatorial-Tucanoan	10	0.5	0	0.1	0.4	Torrioni et al. (1993)
Quechua-Areqipa	que1	Andean	22	0.091	0.682	0.136	0.091	Fuselli et al. (2003)
Quechua/Nimachinguenga	que2	Andean	22	0.091	0.545	0.045	0.273	Fuselli et al. (2003)
Quechua-Tayacaja	que3	Andean	61	0.213	0.328	0.131	0.295	Fuselli et al. (2003)
Quechua-Beni	QUE4	Andean	32	0.156	0.75	0.094	0	Bert et al. (2001)
Quechua	que5	Andean	19	0.263	0.368	0.053	0.316	Merriwether et al. (1995)
Surui	sur	Equatorial-Tucanoan	24	0.05	0.05	0	0.9	Lobato da Silva et al. (2001)
Taino	tai	Equatorial-Tucanoan	29	0	0	0.75	0.25	Lalteza et al. (2001)
Tehuelche	teh	Andean	29	0	0.207	0.241	0.552	Goicoechea et al. (2001)
Teribe	ter	Chibcha-Paezan	20	0.8	0.2	0	0	Torrioni et al. (1994)
Ticuna	tic	Equatorial-Tucanoan	28	0.179	0	0.321	0.5	Torrioni et al. (1993)
Tiwanaku	tiw	Unknown	13	0.08	0.15	0.23	0.23	Rothhammer et al. (2003)
Toba	tob	Ge-Pano-Carib	30	0.133	0.467	0.067	0.267	Demarchi et al. (2001)
Trinitario	TRI	Equatorial-Tucanoan	35	0.143	0.4	0.371	0.029	Bert et al. (2001)
Waiwai	wai	Ge-Pano-Carib	26	0.154	0.154	0.423	0.269	Bonato et al. (1997)
Wapishana	wap	Equatorial-Tucanoan	12	0	0.25	0.083	0.667	Torrioni et al. (1993)
Wayuu	way	Equatorial-Tucanoan	40	0.25	0.35	0.38	0	Mesa et al. (2000)
Xavante	xav	Ge-Pano-Carib	25	0.16	0.84	0	0	Ward et al. (1996)
Yaghan	yag	Andean	21	0	0	0.43	0.477	Moraga et al. (2000)
Yanomama	yan	Chibcha-Paezan	24	0	0.167	0.542	0.292	Torrioni et al. (1993)
Yuracare	YUR	Equatorial-Tucanoan	28	0.393	0.321	0.214	0.036	Bert et al. (2001)
Zenu	zen	Unknown	37	0.19	0.41	0.3	0.05	Mesa et al. (2000)
Zoro	zor	Equatorial-Tucanoan	30	0.2	0.067	0.133	0.6	Ward et al. (1996)

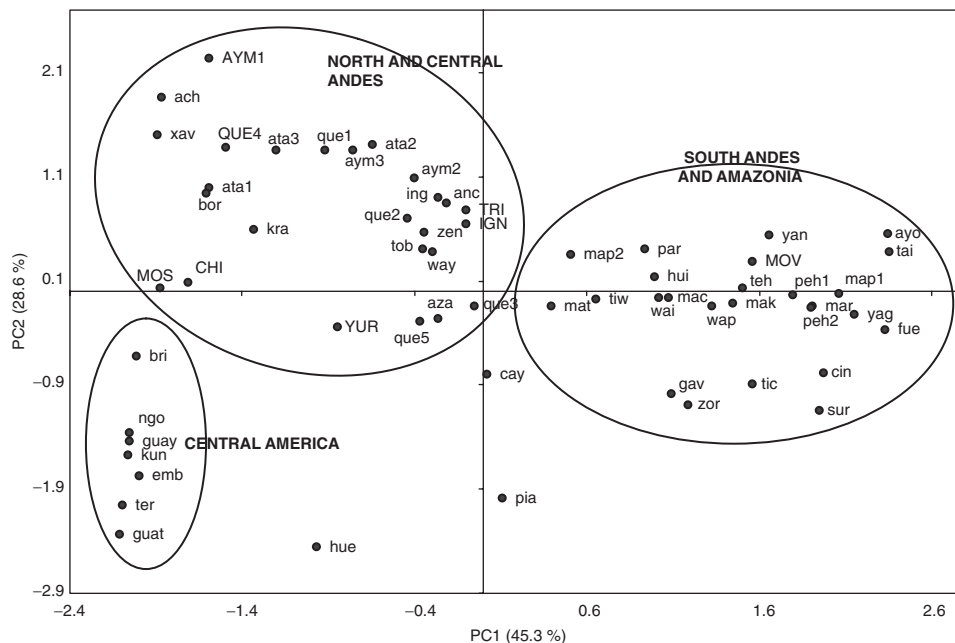


Figure 5. Principal component analysis based on the frequency of the mtDNA haplogroups of the Amerindian populations available from Central and South America (abbreviations in lower case letters as in Table VI) and populations from Beni Department of Bolivia reported by the authors (abbreviations in upper case letters).

correlates with the frequency of the sum of A and B haplogroups vs. the sum of C and D. The second principal component is responsible for 28.6% of variance and discriminates, respectively, haplogroup A from B and haplogroup C from D.

It can be seen that Amerindian populations are graphically distributed in the PCA in three major geographic groups: the first one, constituted by Central America populations, is characterized by high frequencies of haplogroup A, the second group, formed by a set of populations from North and Central Andes, has a clear prevalence of haplogroup B mixed with variable frequencies of the rest of the haplogroups, and a third cluster of populations, constituted by a diverse set of ethnic groups from Amazonia and the South Andes presents elevated frequencies of haplogroups C and/or D. There are some exceptions within these three geographic clusters, with populations positioned out of the places that they belong, as in the case of the Boruca from Central America, the Xavante and Kraho from Brazil and the Ache from Paraguay placed into the North Central Andean group, and the Piaroa and Cayapa standing out of the main Amazonian cluster.

All the Beni Piedmont populations are located in the PCA figure in the North and Central Andes cluster. The Aymara and Quechua from Beni Piedmont belong mainly to haplogroup B, making them located quite close in this cluster. Other Aymara and Quechua groups, living out of Bolivia and reported by other authors, are amply distributed in this cluster showing a high level of intra-group variation. The Chimane and Moseten groups also fit into the North-Central Andean cluster but in an isolated position. This is because they are the only populations with high frequencies of the haplogroups A and B but in the same percentage.

Considering the rest of the groups from the Beni Department living in the 'Llanos de Moxos' (Ignaciano, Trinitario, Movima and Yuracare), all haplogroups are represented (Bert et al. 2004). Only one population of those previously mentioned, the Movima, are placed in the South Andes–Amazonia cluster. It is especially significant that populations from Beni occupy very distant spots, despite the reduced size of this geographic area. The Chimane and Moseten living in the Piedmont and the Ignaciano and Trinitario living in the 'Llanos' occupy opposite positions in the cluster, even though the area of distribution of these ethnic groups overlaps. This fact is also true for the Aymara, Quechua, Yuracare and Movima populations.

Analysis of molecular variance

To establish the genetic relation among the Bolivian populations living in the Piedmont and 'Llanos de Moxos' with the rest of Andean and Amazonian native Americans, we applied the AMOVA analysis considering groups of populations under different linguistic and geographic criteria. The molecular variance observed can be divided into three components: variance within populations, variance among groups of populations, and variance among populations within a group (Excoffier et al. 1992). Most of the variance observed is at the intra-population level. At the inter-population level, higher values of variance among groups of populations, combined with lower values of variance among populations within a group, indicates the reliability of the clustering criteria and the genetic relationship between the populations that shape a cluster.

Using this assumption, the best values are obtained under mixed geographic and linguistic criteria, distinguishing three clusters of populations: (1) Central America, (2) North and Central Andean and (3) South Andean and Amazonian. These results are in accordance with the figure obtained in the PCA. Concerning the Beni populations the highest AMOVA values are obtained when we clustered all the Piedmont populations adding the Ignaciano, Trinitario and Yuracare of the 'Llanos' into the North-Central Andes cluster and the Movima into the South Andes-Amazonia cluster. The third cluster consists of the Central Amerindian Chibchan-speaking group. The percentage of variance due to among-group variation is 25.81% and the percentage of variance among populations within a group is 8.07%. In this analysis the Ge-speaking populations, Xavante and Kraho, are also in the North-Central Andean cluster although their original area is Amazonian.

The AMOVA results indicate that Beni Bolivian populations, except Movima, are more related to the North-Central Andean populations than to the Amazonian ones and the linguistic affiliation is the best criterion to explain the genetic relationships between these populations.

Discussion

Many authors have pointed out the difficulty in explaining the early human dispersal processes that resulted in the peopling of South America but most of them consider two main areas of discontinuity in the continent: the Andean area and the Amazonian basin. The first region is geographically characterized by the Andean and Pre-Andean hills and may have been settled using the Pacific coastline and/or using the 'altiplano' corridor as a natural pathway, around 12 000 years ago. The second area includes the whole Amazonian region colonized from the Atlantic coast using the principal river basins to penetrate into the

different Amazonian ecosystems at different times. The southern part of the continent was probably colonized from the Atlantic and Pacific coast by small groups of hunter-gatherers in different migration waves. Native populations who nowadays inhabit this last region seem to have more genetic affinities with Amazonian populations.

The Piedmont is a region in transition between these two main areas. The genetic characterization of the populations living there is still too incomplete to establish the relevance of this area in the peopling processes of the South American continent. The reason for this study is to elucidate if these populations are more related to either the Andean or Amazonian groups or if they represent a restricted and distinctive group of populations.

From an ecological point of view the predominant ecosystem of the Piedmont is tropical forest shifting to sub-tropical, with a higher influence of Amazonian than Andean in composition. Patterns of human settlement are similar to the Amazonian populations, characterized by dispersed and reduced population pools. Despite these considerations the results obtained in PCA, AMOVA and genetic distances analysis revealed that the groups that live in the Beni Piedmont (Aymara, Quechua, Chimane and Moseten) share more similarities with the populations of North-Central Andes than with populations from South Andes and Amazonia. This would be expected for Aymara and Quechua, populations that are mainly inhabitants of the highland although their territory extends to the Piedmont, and who can be considered from all points of view as Andean groups, but not for Mosetenan groups (Chimane and Moseten) with features more associated with Amazonian populations.

Phylogenetic trees derived from the genetic distances tend to cluster Amerindian populations by geographic proximity and linguistic affinity. We observe again, that the populations from Piedmont join in a cluster together, indicating the existence of a certain degree of genetic flow among these populations. The fact that the Quechua living in the Beni Piedmont show a greater affinity with the Aymara than other Quechua groups could be due to some historic and geographic peculiarities of this population. In the North-Central Andean region, where complex social structures developed over centuries achieved high demographic levels (Stanish 2001), an important degree of gene flow might have occurred, so this vast territory might have functioned as a homogeneous genetic space compared with other South American habitats. It is not clear if the existence of different and complex societies operate as an obstacle to gene flow in populations that share common territories, cultural affinities and natural resources during long time periods. At the border of the Andean zone, the Piedmont and the valleys of Ecuador, Peru and Bolivia, the peripheral groups of Quechua would experience, depending on the grade of interaction, events of admixture with the autochthonous populations or diverse processes of genetic drift that would cause the genetic differentiation that is nowadays observed in the area. The Aymara and Quechua populations studied in the present article could be an example of this last phenomenon.

When a more extensive area is analysed, adding the Eastern 'Llanos de Moxos' populations (Ignaciano, Trinitario, Yuracare and Movima) the complexity of the genetic relationships among all these Bolivian populations increases. In this sense, the θ_K statistic analysis has been especially useful. Fuselli et al. (2003) has indicated that high within-population variability in Andean populations vs. those in Eastern parts of the continent could be due to differences in cultural and demographic historical patterns. If so, the results obtained using the θ_K statistic in the groups living in Piedmont and 'Llanos de Moxos' of Beni are opposed to those expected. Nevertheless, we maintain that the genetic diversity observed in the studied populations can easily be explained by the existence of numerous migrations in the area following natural resources. These eventually resulted in complex interactions among groups, conformed not only by linguistic and cultural differences

but also affected by recent processes of religious reductions and genetic admixture (O'Rourke et al. 1992). The Moxos Indians, with high values of θ_K , were the result of an aggregation of many Arawakan-speaking populations joined for religious and cultural education (called 'Reductions') by Jesuits in the 16th century whereas the Movima, who show values of θ_K similar to other Amazonian groups, were placed in 'Reductions' formed exclusively by Movima-speaking individuals. Archaeological studies indicate, in addition, that the advanced techniques of subsistence practised by the Moxos Indians would require large population sizes (Erickson 1995).

The values obtained for some diversity genetic parameters obtained from sequences of mtDNA in the studied populations show that diversity in this area is high and similar to that in other larger regions in South America. These high diversity values could indicate either that the Piedmont population might not have passed through a population bottleneck or, more likely, that recent migration processes involving genetic admixture took place. The high levels of genetic variation observed would be in accordance with the hypothesis of Salzano and Callegari-Jacques (1988) that the area formed by the Center-West of Bolivia and the north of the Chaco could be a space of genetic convergence or divergence.

The results obtained reveal that the Piedmont and the 'Llanos de Moxos' were not a barrier in the dispersal of human groups between the Andes and Amazonia. A more plausible assumption is that the Piedmont constituted a corridor between these two different ecoregions. Despite the permeability of this region, the populations living there have maintained their own cultural and genetic specificity, in this sense the Beni Piedmont populations must be considered different from the Andean and Amazonic ones. Clear evidence of the complexity of arriving at an explanation of the former human movements in this delimited region is the simultaneous presence of ancient Tucano-speaking Amazonian populations, like the Movima, the presence of vestiges of the Arawakan human expansion, like Ignaciano and Trinitario who arrived to the 'Llanos de Moxos' in more recent times, the existence of barely influenced populations speaking isolated languages, like Chimane and Mosen, and the arrival of the Andean Aymara and Quechua peoples in the Piedmont and Llanos.

Acknowledgements

This study was funded by the Spanish DGICYT Project PB97-925. We are grateful to Dr Castro of San Ignacio Hospital, Dra. Greet Diltiens and Dra. Roser Montagut for their cooperation in the collection of samples. We are also grateful to Dr J. Cerdà of the Laboratorio de Biología 'San Calixto' from La Paz, Bolivia, for his help.

References

- Altamirano DF. 1979. Historia de la Misión de los Mojos. La Paz, Bolivia: Instituto Boliviano de la Cultura.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MH, Coulson AR, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- Baillet G, Rothhammer F, Carnese F, Bravi C, Bianchi NO. 1994. Founder mitochondrial haplogroups in Amerindian populations. *Am J Hum Genet* 55:27-33.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48.
- Batista O, Kolman CJ, Bermingham E. 1995. Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panama. *Hum Mol Genet* 4:921-929.

- Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A, Turbón D. 2001. Major mitochondrial DNA haplotype heterogeneity in highland and lowland Amerindian populations from Bolivia. *Hum Biol* 73:1–16.
- Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A, Turbón D. 2004. Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracare Amerindian populations from Bolivia lowlands. *Ann Hum Biol* 31:9–28.
- Bonato SL, Salzano FM. 1997. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc Nat Acad Sci* 94: 1866–1871.
- Cerron-Palomino R. 1987. Unidad y diferenciación lingüística en el mundo andino. *Lexis* 11:71–104.
- Chicchon A. 1992. Chimane resource use and market involvement in the Beni Biosphere Reserve, Bolivia. Doctor of Philosophy Dissertation, University of Florida.
- Díez Astete A, Murillo D. 1998. Pueblos indígenas de tierras bajas. La Paz: MDSP-VAIPO-PNUD.
- Demarchi DA, Panceta-Dutary GM, Motran CC, Basualdo MAI, Marcellino AJ. 2001. Mitochondrial DNA haplogroups in Amerindian populations from the Gran Chaco. *Am J Phys Anthropol* 115:199–203.
- Denevan W. 1966. The Aboriginal cultural geography of the Llanos de Moxos of Bolivia. *Ibero-Americana*: 48. Berkeley: University of California Press.
- D'Orbigny A. 1944. *El hombre americano*. Buenos Aires: Ed. Futuro.
- Dornelles CL, Battilana J, Fagundes NJR, Freitas LB, Bonatto SL. 2004. Mitochondrial DNA and Alu Insertions in a Genetically Peculiar Population: The Ayoreo Indians of Bolivia and Paraguay. *Am J Hum Biol* 16:479–488.
- Erickson CL. 1995. Archaeological perspectives on ancient landscapes of the Llanos de Mojos in Bolivian Amazon. In: Peter Stahl, editor. *Archaeology in the American Tropics: Current analytical methods and applications*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 66–95.
- Ewens WJ. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor Popul Biol* 3:87–112.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 136:479–491.
- Fahmy T. 1995. XLSTAT (7.5.2) Software. New York: Addinsoft.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (phylogeny inference package); version 3.572c. Distribution by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.
- Forster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ. 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: A reappraisal. *Am J Hum Genet* 59:935–945.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.
- Fuselli S, Tarazona-Santos E, Dupanloup I, Soto A, Luiselli D, Pettener D. 2003. Mitochondrial DNA diversity in South America and the genetic history of Andean highlanders. *Mol Biol Evol* 20:1682–1691.
- García-Bour J, Pérez-Pérez A, Álvarez 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. *Am J Phys Anthropol* 123:361–370.
- Ginther C, Corach D, Penacino GA, Rey JA, Carnese FR, Hutz MH, Anderson A, Just J, Salzano FM, King MC. 1993. Genetic Variation among the Mapuche Indians from the Patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ, editors. *DNA fingerprinting: state of the science*, pp. 290–324. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag.
- Goicoechea AS, Carnese FR, Dejean CB, Avena SA, Weimer TA, Franco MH, Callegari-Jacques S, Estalote A, Simoes ML, Palatnik M, et al. 2001. Genetic relationships between Amerindian populations of Argentina. *Am J Phys Anthropol* 115:133–143.
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R. 1992. CLUSTAL V: Improved software for multiple sequence. *Nucleic Acids Res* 26:126–129.
- Kolman CJ, Bermingham E, Cooke R, Ward RH, Arias TD, Guionneau-Sinclair F. 1995. Reduced mtDNA diversity in the Ngöbe Amerinds of Panamá. *Genetics* 140:275–283.
- Lalueza C, Pérez-Pérez A, Prats E, Cornudella L, Turbon D. 1997. Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum Mol Genet* 6:41–46.
- Lalueza C, Luna F, Calafell F, Morera B, Bertranpetit J. 2001. mtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean. *Ann Hum Genet* 65:137–151.
- Lewis CM, Tito RY, Lizárraga B, Stone AC. 2004. Land, language, and loci: mtDNA HV1 in Native Americans and the genetic history of Perú. *Am J Phys Anthropol* 127:351–360.
- Lobato-da-Silva DF, Ribeiro-dos-Santos AKC, Santos SEB. 2001. Diversidade genética de populações humanas na Amazônia. In: Vieira ICG, Silva JMC, Oren DC, D'Incao MA, orgs. *Diversidade Humana e Cultural na Amazônia*, pp 167–193. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi.

- Lynch TF. 1983. The Paleo-Indians. In: Jennings JD, editor. *Ancient South Americans*. San Francisco: WH Freeman. pp 87–138.
- Lynch TF. 1990. Glacial-age man in South America? A critical review. *Am Antiquity* 55:12–36.
- MacNeish RS. 1971. Early man in the Andes. *Sci Am* 224:34–46.
- Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell RE. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am J Phys Antropol* 98:411–430.
- Merriwether DA, Kemp BM, Crews DE, Neel JV. 2000. Gene flow and genetic variation in the Yanomama as revealed by mitochondrial DNA. In: Renfrew C, editor. *America past, America present: Genes and languages in the Americas and beyond*. Cambridge, UK: The McDonald Institute for Archaeological Research. pp 84–124.
- Mesa NR, Mondragón MC, Soto ID, Parra MV, Duque C, Ortiz-Barrientos D, García LF, Velez ID, Bravo ML, Múnera JG, et al. 2000. Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in Amerinds: Pre- and post-Columbian patterns of gene flow in South America. *Am J Hum Genet* 67:1277–1286.
- Moraga M, Aspillaga E, Santoro C, Standen V, Carballo P, Rothhammer F. 2001. mtDNA analysis of mummies from northern Chile endorse the hypothesis of an Amazonian origin of Andean populations. *Revista Chilena de Historia Natural* 74:719–726.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- O'Rourke DH, Mobarry A, Suarez BK. 1992. Patterns of genetic variation in Native America. *Hum Biol* 64:417–434.
- Rickards O, Martínez-Labarga C, Lum JK, De Stefano GF, Cann RL. 1999. mtDNA history of the Cayapa Amerinds of Ecuador: Detection of additional founding lineages for the Native American populations. *Am J Hum Genet* 65:519–530.
- Riester J. 1993. *Universo Mítico de los Chimane. Pueblos Indígenas de las Tierras Bajas de Bolivia*. La Paz, Bolivia.
- Rocco P, Morales G, Moraga M, Miquel JF, Nervi F, Llop E, Carvallo P, Rothhammer F. 2001. Composición genética de la población Chilena: Distribución de polimorfismos de DNA mitochondrial en grupos aborígenes y en la población mixta de Santiago. Santiago: Revista médica de Chile.
- Rothhammer F, Llop E, Carvallo P, Moraga M. 2001. Origin and evolutionary relationships of native Andean populations. *High Alt Med Biol* 2:227–233.
- Rothhammer F, Moraga M, Rivera M, Calogero M, Standen V, García F, Carvallo P. 2003. Análisis del ADNmt de restos esqueléticos del sitio arqueológico de Tiwanaku y su relación con el origen de sus constructores. *Chungara, revista de Antropología Chilena* 35:269–274.
- Sakel J. 2004. *A grammar of the Mosaicén, series Mouton Grammar Library 33*. New York: Mouton de Gruyter.
- Santos M, Ward RH, Barrantes R. 1994. mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Hum Biol* 66:963–977.
- Salzano FM, Callegari-Jacques SM. 1988. South American Indians: A case study in evolution. In: GA Harrison. *Research monographs on human population biology*. Oxford: Clarendon Press. pp 199–201.
- Schmitt R, Bonatto SL, Freitas LB, Muschner VC, Hill K, Hurtado AM, Salzano FM. 2004. Extremely limited mitochondrial DNA variability among the Ache Natives of Paraguay. *Ann Hum Biol* 21:87–94.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. *Arlequin ver. 2001: A software for population genetics data analysis*. University of Geneva: Genetics and Biometry Laboratory.
- Stanish C. 2001. The origin of state societies in South America. *Annu Rev Anthropol* 30:41–64.
- Steward J. 1944–1949. *Handbook of South American Indians, 7 vols*. Bureau of American Ethnology Bulletin No. 143. Washington, DC: Smithsonian Institution.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10:512–526.
- Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Nell JV, Larsen M, Schanfield MS, Smith DG. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53:563–590.
- Torroni A, Neel JV, Barrantes R, Schurr TG, Wallace DC. 1994. Mitochondrial DNA 'clock' for the Amerinds and its implications for timing their entry. *Proc Nat Acad Sci* 91:1158–1162.
- Vargas Ugarte RSJ. 1964. *Historia de la Compañía de Jesús en el Perú*. Burgos: Imp. de Aldecoa.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506–513.
- Ward RH, Salzano FM, Bonatto SL, Hutz MH, Coimbra Jr CEA, Santos RW. 1996. Mitochondrial DNA polymorphism in three Brazilian tribes. *Am J Hum Biol* 8:317–323.

3.7

Available online at www.sciencedirect.com

Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1 (2008) 348–349

www.elsevier.com/locate/FSIGSS

Research article

Genetic structure of the population of Beni department (North Bolivia)

Ana María López-Parra^{a,*}, Miriam Tirado^a, Carlos Baeza^a, Francesc Bert^b, Alfonso Corella^b, Alejandro Pérez-Pérez^b, Cristina Gamba^a, Eva Fernández^a, Eduardo Arroyo-Pardo^a^a *Laboratory of Forensic and Population Genetics, Department of Toxicology and Health Legislation, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain*^b *Anthropology Section, Department of Animal Biology, University of Barcelona, Spain*

Received 16 October 2007; accepted 25 October 2007

En el artículo se analizan los Y-STR del cromosoma Y de una muestra de 86 individuos del Departamento del Beni (Bolivia) y se comparan con otras 12 poblaciones del continente Sudamericano, los resultados de los Y-STR indican el grado de diferenciación de nuestra población respecto otras de Sudamérica y del continente europeo.

El Departamento del Beni se encuentra en el nordeste de Bolivia y constituye una región de transición entre la región andina y la amazónica.

Las muestras de sangre se obtuvieron de individuos del sexo masculino no emparentados residentes en el Departamento del Beni. Las muestras fueron tipadas con el Kit de amplificación de PCR AmpF/STR[®] Yfiler[®] (Applied Biosystems). Los productos de la amplificación se secuenciaron en el secuenciador ABI 3730 y los alelos fueron asignados utilizando la cadena *ladder* siguiendo las recomendaciones de la *DNA Commission of the ISFG*.

Se construyeron una serie de base de datos de las frecuencias de Y-STRs, exceptuando DYS385 con las muestras siguientes BRA: Brazil General, BRA_ST: Santa Catarina (Brasil), BRA_RI: Rio de Janeiro (Brasil), COL_AF: Afro-colombianos, COL_ME: Mestizo-caucásicos (Colombia), COL_AN: Antioquia (Colombia), ARG_CO: Córdoba (Argentina), PER: Perú, SAL: El Salvador, ECU: Ecuador, BRA_BE: Belém (Brasil), COL_CA: Cartagena (Colombia), BOL: Beni (Bolivia).

Los Rst's se calcularon utilizando Arlequín ver 3.01 y el árbol de distancias se construyó con el programa Phylip v.3.5. Las coordenadas de cada población y las frecuencias absolutas de los haplotipos Y-STR se usaron para estimar la varianza relativa entre grupos con el programa SAMOVA ver 1.0. MDS se llevó a cabo con el programa SPSS ver 13.0

Entre los 86 individuos estudiados se hallaron 53 haplotipos diferentes para los 15 loci seleccionados, la diversidad haplotípica fue $0,9778 \pm 0,0076$. Un haplotipo se halló en 10 individuos (13-12-17-24-10-13-13-14-11-12-11-19-22-15-15) para DYS19-DYS389I-DYS389b-DYS390-DYS391-DYS-392-DYS393-DYS437-DYS438-DYS439-GATA H4.1-DYS448-GATA C4-DYS458-DYS456), 9 de estos 10 individuos presentaron el genotipo 14-17 (DYS385a,b). Este haplotipo concuerda con la base de datos de referencia del Cromosoma Y (<http://www.yhrd.org>) y con cinco haplotipos vecinos. Todos estos haplotipos fueron de América Central y Sud-América.

La comparación de las muestras del Beni se llevó a cabo utilizando el haplotipo mínimo excepto para DYS385a,b. La distancia genética menor R_{st} entre la población del Beni y otras poblaciones fue con la población de Perú ($R_{st}=0,01875$). La distancia genética mayor se halló ante las poblaciones Afro-Colombianas. Todas las distancias entre la población del Beni (Bolivia) y las del resto del continente fueron significativas.

La separación genética entre las poblaciones del Perú y Beni (Bolivia) respecto al resto de poblaciones Sudamericanas también se puso de manifiesto en el análisis por parejas R_{st} realizado y presentado en los gráficos MDS y *Neighbour-Joining* (ver artículo).

El análisis SAMOVA dio un valor estadísticamente significativo del 22,89% del total de la variación genética cuando se utilizaron los grupos 1: Beni (Bolivia) / Perú, 2: Afro-Colombianos y 3: Resto de poblaciones.

En conclusión, cuando se estudia la variabilidad genética del cromosoma Y se halla una marcada diferenciación entre el conjunto de las muestras de Perú y el Beni respecto al resto de poblaciones.

Research article

Genetic structure of the population of Beni department (North Bolivia)

Ana María López-Parra^{a,*}, Miriam Tirado^a, Carlos Baeza^a, Francesc Bert^b, Alfonso Corella^b, Alejandro Pérez-Pérez^b, Cristina Gamba^a, Eva Fernández^a, Eduardo Arroyo-Pardo^a

^aLaboratory of Forensic and Population Genetics, Department of Toxicology and Health Legislation, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

^bAnthropology Section, Department of Animal Biology, University of Barcelona, Spain

Received 16 October 2007; accepted 25 October 2007

Abstract

We analyze a sample of Y-chromosomes of 86 Bolivians of Beni department (Northern Bolivia). A database of Y-STRs frequencies was constructed with a total of 12 South American samples plus our population. Y-STR structure of the database reveals the degree of differentiation of our sample and the close relatedness of most of the populations considered. Differences can be due in part to the low level of admixture with European Y-chromosomes.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Y-chromosome; Short tandem repeats; Bolivia

1. Introduction

Beni is a Northeastern department of Bolivia, in the lowlands region of the country. Beni constitutes a natural path for migration from north areas into the coastal South and into the lowlands in Amazonia [1].

2. Material and methods

Blood samples were obtained from 86 apparently healthy volunteer donors resident in Beni department, Bolivia. Samples were typed with AmpF ℓ STR[®] Yfiler[®] PCR Amplification Kit (Applied Biosystems). Amplicons were run in an ABI 3730 Sequencer and alleles were assigned using manufacturer's ladder, according to recommendations from DNA Commission of the ISFG [2]. A database of Y-STRs frequencies (minimum haplotype except DYS385) was constructed. Samples: BRA: Brazil General [3], BRA_ST: Santa Catarina, Brazil [4], BRA_RI: Rio de Janeiro, Brazil [5], COL_AF: Afro-Colombian [6], COL_ME: Caucasian-Mestizo, Colombia [6], COL_AN: Antioquia, Colombia [7], ARG_CO: Cordoba, Argentina [8], PER: Peru [9], SAL: El Salvador [10], ECU: Ecuador [11], BRA_BE: Belém, Brazil [12], COL_CA:

Cartagena, Colombia [13], BOL: Beni, Bolivia. Rst's were calculated using Arlequin ver 3.01 [14] and distance tree was drawn using Phylip v.3.5 [15]. Geographical coordinates of each population and absolute frequencies of Y-STR haplotypes were used to estimate groups of relative low invariance through software SAMOVA ver 1.0 [16]. MDS over Rst was carried out through SPSS ver 13.0.

3. Results and discussion

Among the 86 individuals studied, 53 different haplotypes were identified for the 15 loci selected with a haplotype diversity of 0.9778 ± 0.0076 . One haplotype was found in 10 individuals (13-12-17-24-10-13-13-14-11-12-11-19-22-15-15 for DYS19-DYS389I-DYS389b-DYS390-DYS391-DYS392-DYS393-DYS437-DYS438-DYS439-GATA H4.1-DYS448-GATA C4-DYS458-DYS456) and 9 out of these 10 individuals present the genotype 14-17 (DYS385a,b). This haplotype matches just once in Y-chromosome haplotype reference database (<http://www.yhrd.org>) and with five haplotype neighbors. All these haplotypes were from Central or South America. Comparison of Beni sample with available published data was performed using minimal haplotype except DYS385a,b. The smallest genetic distances Rst between Bolivia and the other populations were obtained against Peru (Rst = 0.01875). The bigger genetic distance was obtained

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3941576; fax: +34 91 3941606.
E-mail address: amlopezparra@med.ucm.es (A.M. López-Parra).

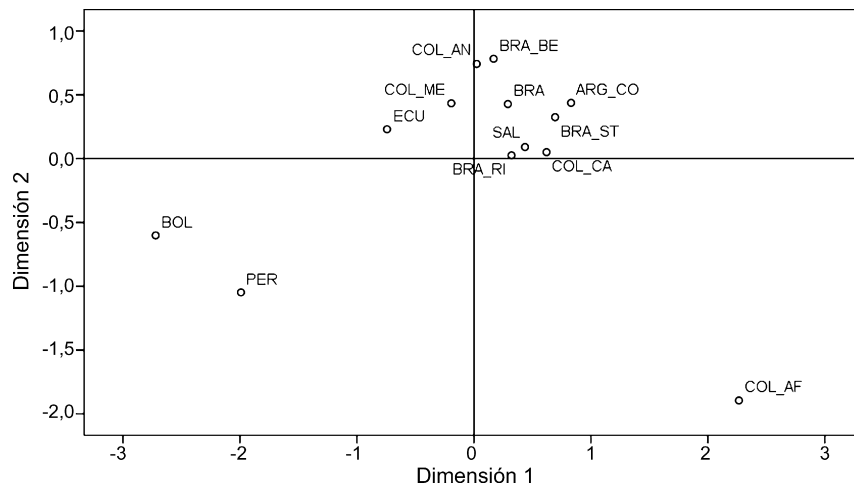


Fig. 1. Plot of MDS analysis over Rst values from Y-STR haplotypes. Stress value: 0.051.

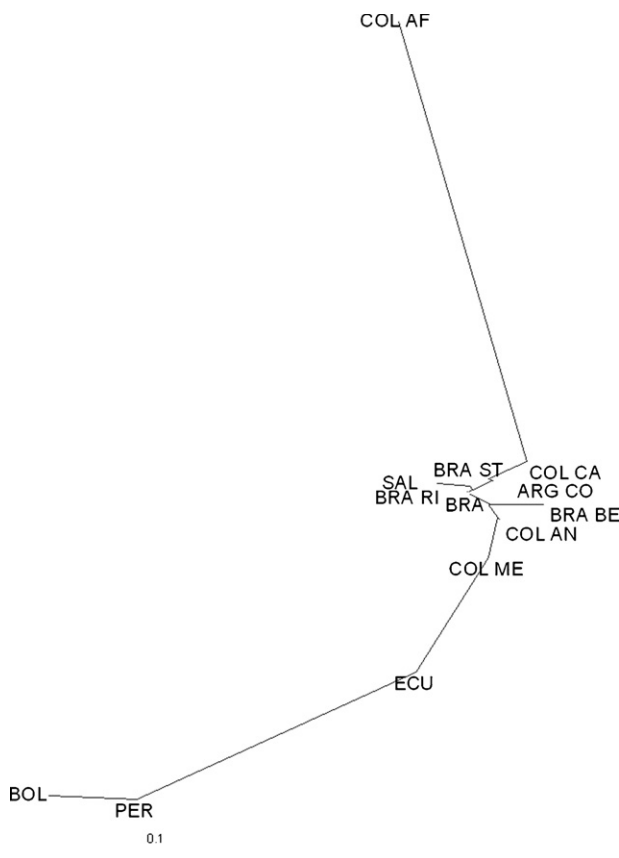


Fig. 2. Neighbor-Joining tree based on Rst distance.

against Afro-Colombian. All distances between Bolivian and the other populations were significant. The genetic separation of both countries respect to the rest was also revealed in a pairwise analysis of Rst based on Y-STR haplotypes presented by MDS plots (Fig. 1) and Neighbor-Joining tree (Fig. 2). In order to test the geographical population substructure of the database, SAMOVA was performed. A high and statistically

significant level of 22.89% of the total genetic variation being explained between groups was observed when $K = 3$ (Group 1: Peru and Bolivia; Group 2: Afro-Colombian and Group 3: the rest).

4. Conclusion

In the case of the Y-chromosome genetic variation, these results demonstrate a strong and statistically significant genetic differentiation between the two samples of Peru and Beni (Bolivia). On the other hand, the rest of the samples shows a much higher degree of genetic relatedness, the differences being due in part to the degree of European admixture.

Conflict of Interest

None.

References

- [1] Bert, et al. Hum. Biol. 73 (2001) 1–16.
- [2] Gusmão, et al. For. Sci. Int. 157 (2006) 187–197.
- [3] Grattapaglia, et al. For. Sci. Int. 149 (2005) 99–107.
- [4] Cainé, et al. For. Sci. Int. 148 (2005) 75–79.
- [5] de Souza Góes, et al. Int. J. Legal Med. 119 (2005) 70–76.
- [6] Yunis, et al. For. Sci. Int. 151 (2005) 307–313.
- [7] Gaviria, et al. For. Sci. Int. 151 (2005) 85–91.
- [8] Fondevila, et al. For. Sci. Int. 137 (2003) 217–220.
- [9] Iannacone, et al. J. For. Sci. 50 (1) (2005) 1–4.
- [10] Saul, et al. For. Sci. Int. 142 (2004) 45–49.
- [11] Baeza, et al. For. Sci. Int. (in press).
- [12] de Jesus Brabo Ferreira Palha, et al. For. Sci. Int. 166 (2007) 233–239.
- [13] Builes, et al. For. Sci. Int. 167 (2007) 62–69.
- [14] Schneider, et al., Arlequin. Ver 3.01, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.
- [15] Felsenstein, PHYLIP ver. 3.57c, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.
- [16] Dupanloup, et al. Molecular Ecology 11 (2002) 2571–2581.

3.8

Annals of Human Biology, September–October 2008; 35(5): 554–562

informa
healthcare

HUMAN BIOLOGICAL SURVEYS

**HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX
polymorphisms in Amerindian populations living
in the Beni Department of Bolivia**

ALFONS CORELLA¹, FRANCESC BERT¹, ALEJANDRO
PÉREZ-PÉREZ¹, MANEL GENÉ², & DANIEL TURBÓN¹

¹*Secció Antropologia, Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, 08 028 Barcelona, Spain and* ²*Departament de Medicina Legal, Laboratori de Genètica Forense, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

(Received 29 May 2007; revised 8 June 2008; accepted 18 June 2008)

El siguiente estudio completa los estudios previos realizados por los autores sobre la población autóctona del Departamento del Beni en Bolivia. Se presenta y analiza la frecuencia de cuatro *short tandem repeats* (STR's) HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO y HUMTPOX en poblaciones del Departamento del Beni (Bolivia)

Desde un punto de vista del asentamiento, muchas veces los individuos de una comunidad pertenecen a una sola etnia pero otras veces podemos encontrar individuos de diferentes etnias cohabitando en una misma comunidad, este es el caso de los grupos Mojeño, Movima, Yuracaré y Mosetenes analizados en el presente estudio, nos referimos al conjunto de todos ellos como poblaciones Benianas. Estas poblaciones presentan características amazónicas en cuanto a su estructura social y uso de los recursos, en el pasado, dichas poblaciones dieron forma al paisaje beniano y lo transformaron para usos agrícolas de igual forma que hicieron sus contemporáneos andinos a orillas del lago Titicaca. Otros grupos de poblaciones utilizados son la población Quechua y la población Aymará que desde los años 50 del siglo pasado viven en la región, dichas poblaciones fueron estudiadas previamente

para estos marcadores (Gené et al, 1998; 2000) , también se utilizaron las frecuencias obtenidas hasta el momento de otras poblaciones nativas del continente Americano.

Las muestras analizadas consistieron en dos bulbos pilosos para cada uno de los 113 individuos Quechua, 137 individuos Aymará y 136 individuos Beniños de ambos sexos que previamente y mediante una encuesta “*in situ*” se aseguraba que no estaban emparentados. El ADN se extrajo utilizando CheelexTM 100 utilizando el método descrito por Walsh et al. (1991).

La amplificación de los cuatro loci de los microsatélites tetraméricos se realizó según el protocolo propuesto por Edwards et al. (1992), Kimpton et al. (1992) y Huang et al. (1995).

Una vez obtenidas las frecuencias de cada alelo para cada locus se aplicó la técnica del análisis de componentes principales (PCA) para comparar las diferentes poblaciones. El PCA se obtuvo comparando las frecuencias alélicas de HUMTH01 y HUMCSF1PO para las poblaciones de Bolivia y otras del continente Sudamericano utilizando el paquete estadístico SPSS v16 (*Statistical Package for Social Sciences*).

Se calcularon parámetros como el índice de heterozigosis (H) y la posible desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) utilizando el test exacto de Guo y Thompson (1992). El desequilibrio de ligamiento se calculó con el programa GENEPOP v1.2. También se calculó el poder de discriminación (PD) y la probabilidad de exclusión (CE).

Para el locus HUMTH01 se encontraron 6 alelos diferentes, tres de ellos con 6, 7 y 10 repeticiones que presentaban altas frecuencias en la muestra estudiada. Para el alelo HUMVWA31A se encontraron 8 alelos diferentes pero sólo tres (15, 16 y 17 repeticiones) se hallaron con frecuencias relativamente altas en todas las poblaciones estudiadas. Para HUMCSF1PO se hallaron 6 alelos diferentes, los más frecuentes fueron los de 10, 11 y 12 repeticiones. El locus HUMTPOX presentó 5 alelos totales y los más frecuentes fueron los de 8 y 11 repeticiones.

El análisis de componentes principales realizado con el conjunto de poblaciones Amerindias disponibles incluyendo las del presente estudio Aymará, Quechua y Beni señaló que el primer componente era responsable del 36,2 % de la varianza y discriminaba claramente el conjunto de poblaciones Sudamerindias de las poblaciones Dogrib (América del norte) y Cabecar (América central). El segundo componente principal explicaba el 23,6% de la varianza observada y relacionaba las poblaciones Aymará, Quechua y Beni con el resto

de poblaciones sudamericanas aunque las tres poblaciones estudiadas quedaban estadísticamente más próximas, éste hecho indicaría un cierto grado de flujo génico entre dichas poblaciones, tal y como ya se había observado en los estudios previos utilizando ADNmt (Bert et al. 2001).

HUMAN BIOLOGICAL SURVEYS

HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms in Amerindian populations living in the Beni Department of Bolivia

ALFONS CORELLA¹, FRANCESC BERT¹, ALEJANDRO PÉREZ-PÉREZ¹, MANEL GENÉ², & DANIEL TURBÓN¹

¹*Secció Antropologia, Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, 08 028 Barcelona, Spain and* ²*Departament de Medicina Legal, Laboratori de Genètica Forense, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

(Received 29 May 2007; revised 8 June 2008; accepted 18 June 2008)

Abstract

This report presents allele frequency and absolute genotype data of the short tandem repeat (STR) loci HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX for three autochthonous Amerindian populations living in the Beni Department of Bolivia. These related groups are the Quechua, Aymara and Beni populations all living in specific although sometimes overlapping areas that extend from the Andean habitat to the lowland Llanos de Moxos savannah passing through the Piedmont hills. The usefulness of these loci for paternity and identification testing was also examined. The present work completes previous genetic studies performed by the authors in these populations including mtDNA haplogroups (Bert et al., *Hum Biol*, 73:1–16, 2001) and HVRI data (Bert et al., *Ann Hum Biol* 31:9–28, 2004; Corella et al., *Ann Hum Biol* 34:34–35, 2007).

Keywords: *STR variation, South American Indians, Moxos*

Background

The present work completes previous genetic studies performed by the authors in these populations including mtDNA haplogroups (Bert et al. 2001) and HVRI data (Bert et al. 2004; Corella et al. 2007).

Sample

Differences amongst populations living in the Beni Department have been generated by a continuous interaction between ecology, economy, and ethnicity. The human settlement

Correspondence: Daniel Turbón, Secc. Antropologia, Dpto Biologia Animal, Fac. Biologia, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 645, Barcelona 08 028, Spain. E-mail: turbon@ub.edu

ISSN 0301–4460 print/ISSN 1464–5033 online © 2008 Informa UK Ltd.
DOI: 10.1080/03014460802294243



pattern of this region is based on dispersed communities of reduced size. Sometimes all the individuals of a community belong to one ethnic group but in other cases individuals of different groups coexist. Most of the Amerindian people living in the Beni Department belong to ethnic groups of reduced population sizes with Amazonian traits, living exclusively in this geographical area. This is the case for the groups Mojeño, Movima, Yuracare and Mosestenean reported in this study. We referred to the results obtained for this set of populations as 'Beni population'. Nevertheless we can also find Amerindians living in the Beni that belong to the groups Quechua and Aymara who are populations with Andean traits and considered as colonizers in this area.

Taking into account south Amerindian populations, Quechua and Aymara represent the major social and linguistic groups of all the countries in an Andean context. The Quechua constitute the main population in the Andean region, and their language is one of the most spoken native languages in America.

Quechua is spoken in seven countries and it cannot be considered exclusively an Andean language since it is widely used also in the Amazonian region. Quechua speakers include 4.4 million inhabitants in Peru, 2.2 million in Ecuador, 1.6 million in Bolivia, 120 000 in Argentina and over 5000 speakers in Colombia, Brazil and Chile (Cerrón-Palomino 1987).

Aymara is made up of around 2.2 million people living in Bolivia and Peru, particularly around Titicaca Lake, most of them speaking the Aymara language. Aymara and Quechua languages belong to the Andean family stock. The presence of both Andean groups in the Beni was more intense from the 1950s when they arrived as colonizers.

The Beni population stock is formed by a compilation of groups that shaped and transformed the landscape by intense agricultural activity. These groups living around the Beni and Mamoré rivers exchanged goods, such as metals, coca, wood, wax, honey and exotic birds, with highland communities for centuries. The major Beni groups are Mojeños, Movima, Yuracare and Mosestenean.

'Mojeños' is a geographical term referring to the Llanos de Moxos where they live. 'Mojeños' speak different languages related to the widespread Arawakan linguistic stock. The estimated population size at present is around 38 000 people. These ethnic groups practise a developed agriculture.

Around 6000 Movima Indians live today in several communities situated near the Santa Ana de Yacuma city. No more than 1000 still speak the Movima language, an unclassified language belonging to the Equatorial-Tucanoan subgroup of the Amerind language stock (Ruhlen 1991). The history of this group is poorly known. Their presence in the Llanos de Moxos is reported by the Jesuit missionaries in the last quarter of the 17th century. They inhabited minor rivers and open savannah at this time with an agricultural practice less sophisticated than 'Mojeños'.

The Yuracare population was historically less structured than 'Mojeños' and Movima, with a hunter-gatherer way of life and some basic agricultural practices. Their villages are dispersed and have small population sizes. Their population is today estimated at 3000 people.

The Mosestenean speak a Macro-Panoan language belonging to the Ge-Pano stock. The Mosestenean population is estimated around 7000 people. They live in the region of the Maniqui River, in the foothills of the Andes. The Mosestenean settlements are made up of a few houses where nuclear families live. They are semi-nomads and make seasonal movements in order to find their natural resources. Their economy is based on hunting, fishing and an elemental agricultural system of 'roza-tumba-quema'.

Figure 1 shows the geographic location of these groups into the Bolivian country.

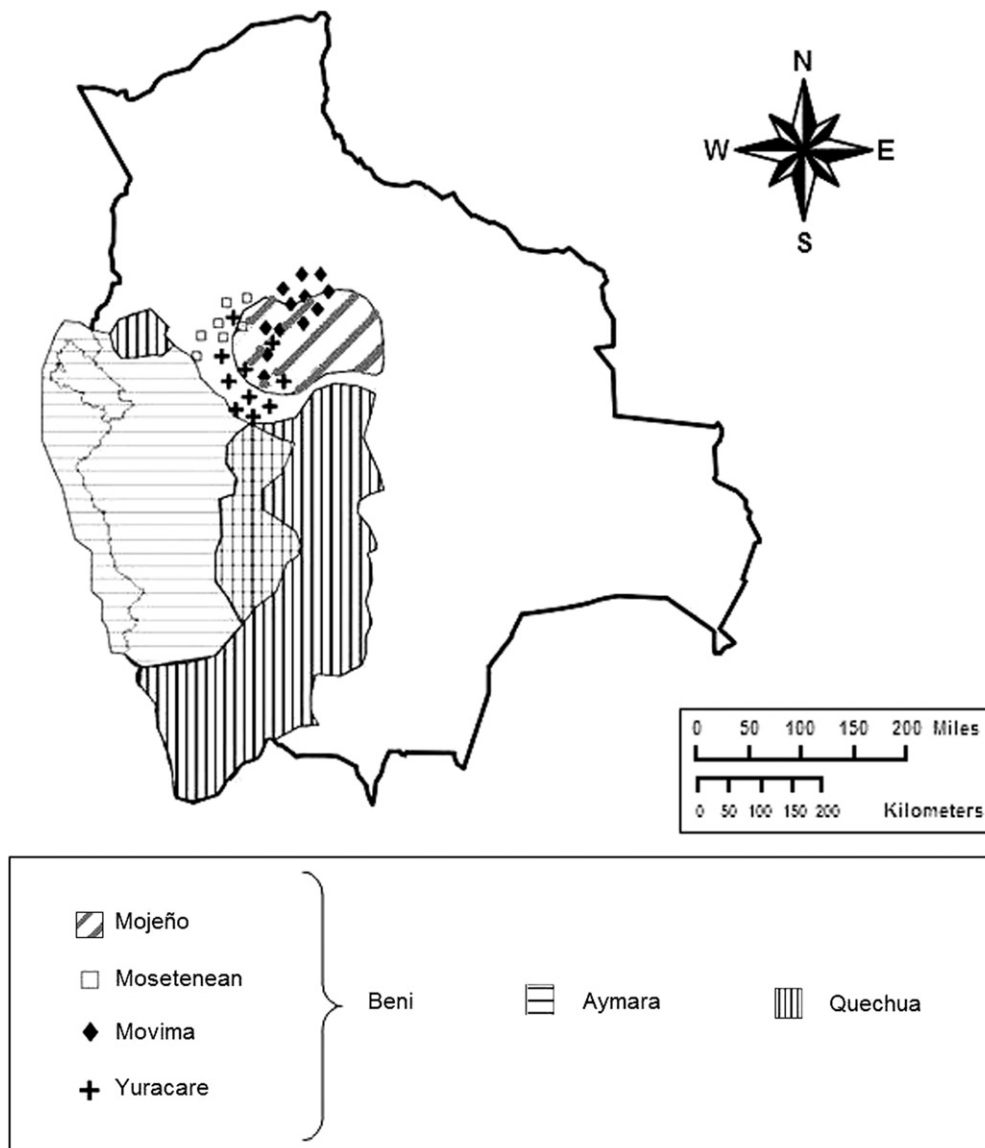


Figure 1. Map showing the geographic location of the populations studied in the Beni department of Bolivia.

Data collection

DNA was extracted from pulled-out hairs with their root bulbs preserved, and final results were obtained for a sample of 386 individuals (both sexes): Quechua ($n = 113$), Aymara ($n = 137$), and Beni stock ($n = 136$). Samples were stored in sterile tubes until analysed in laboratory. Strong selection criteria were applied to whole individuals considered. Their family relationships and ethnicity were determined *in situ* by a demographic survey performed simultaneously with the sampling. Ethnicity was assigned to individuals based on self-identification during the interview. Only unrelated individuals were studied.

Data management and statistical analysis

PCR amplification and typing

DNA was extracted with Chelex 100 using the method described by Walsh et al. (1991). Amplification of HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX tetrameric short tandem repeat (STR) loci was achieved using the primers described by Edwards et al. (1992), Kimpton et al. (1992) and Huang et al. (1995). Forward primers were labelled with fluorescein amidite at the 5' position.

Singleplex PCR assays were carried out as described by Wiegand et al. (1993) and Möller et al. (1994) for HUMTH01 and HUMVWA31A loci, respectively. Duplex PCRs were performed for HUMCSF1PO and HUMTPOX loci following Gené et al. (1998) method conditions. All PCR amplifications were performed together with negative and positive control samples.

Separation was carried out on 6% (w/v acrylamide bisacrylamide) polyacrylamide denaturing high-performance DNA sequencing gels (Ready Mix Gel ALF grade, Pharmacia). All fresh PCR products were typed twice. Electrophoresis was carried out on the Automated Laser Fluorescent (ALF) DNA Sequencer (Pharmacia) at 1450 V, 38 mA, 45 W and 50°C with laser power at 3 mW for 220 min.

Amplified DNA was mixed with internal fluorescent labelled size standards and external lane ladders were also used for adjustment. Sequenced allelic ladders were used for each system as recommended by the DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics.

Statistical approach

The frequency of each allele for each locus was calculated using the gene count method. Comparisons with other populations were performed by applying a principal component analysis (PCA). The PCA was obtained from the allelic frequencies of the HUMTH01 and HUMCSF1PO using the Native American available data reported for these two markers using the SPSS v16.

Observed heterozygosity (H) was calculated and possible divergence from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was determined by using the exact test proposed by Guo and Thompson (1992). The genotype linkage disequilibrium was calculated using the updated version of GENEPOP (v1.2). The power of discrimination (PD) and the *a priori* chance exclusion value (CE) were calculated.

Results

Table I shows absolute genotype and allele frequencies for the four STR loci and for each population in the studied area. Alleles were designated according to the number of repeats. If we take into account the whole studied populations, the HUMTH01 locus exhibited a total of six alleles, three of them (6, 7 and 10 repeats) showing high frequencies in the sample. The HUMVWA31A locus showed a total of eight alleles but only three (15, 16 and 17 repeats) were found with a relatively high frequency in all populations studied. The HUMCSF1PO locus showed six alleles. The alleles 10, 11 and 12 were the most frequent in the studied populations. HUMTPOX locus exhibited five alleles and the most frequent repeats were alleles 8 and 11.

Table I. Absolute genotype and allele frequencies for the populations reported in the present study for each STR.

(1) Beni population									
HUMTH01									
Allele									Frequency
	6	7	9	10	11				
6	20	47	0	1	0				0.389
7		38	1	3	1				0.566
9			2	0	0				0.022
10				0	0				0.018
11					0				0.004
HUMVWA31A									
Allele									Frequency
	13	14	15	16	17	18			
13	0	0	0	2	0	0			0.008
14		0	2	4	1	0			0.029
15			45	28	11	6			0.561
16				6	9	4			0.242
17					2	1			0.107
18						1			0.053
HUMCSF1PO									
Allele									Frequency
	9	10	11	12	13	14			
9	0	0	1	2	0	0			0.016
10		3	14	17	3	0			0.217
11			11	8	6	2			0.288
12				12	11	0			0.337
13					2	0			0.130
14						0			0.011
HUMTPOX									
Allele									Frequency
	8	9	11	12					
8	15	1	22	9					0.330
9		0	0	0					0.005
11			25	17					0.473
12				5					0.191
(2) Quechua population									
HUMTH01									
Allele									Frequency
	6	7	8	9	10				
6	4	28	0	0	4				0.185
7		37	2	1	23				0.593
8			0	0	0				0.009
9				0	2				0.014
10					7				0.199
HUMVWA31A									
Allele									Frequency
	13	14	15	16	17	18	19	20	
13	0	0	1	0	0	0	0	0	0.005
14		0	0	2	1	0	0	0	0.014
15			5	16	5	2	0	0	0.157
16				10	19	6	3	0	0.315
17					17	10	4	2	0.338
18						3	2	0	0.120

(continued)

Table I. Continued.

19								0	0	0.042
20									0	0.009
HUMCSF1PO										
Allele										Frequency
	9	10	11	12	13					
9	0	0	1	0	0					0.009
10		0	8	10	0					0.164
11			3	20	1					0.327
12				8	4					0.455
13					0					0.045
HUMTPOX										
Allele										Frequency
	8	9	10	11	12					
8	17	0	0	17	7					0.500
9		0	0	0	1					0.009
10			0	0	1					0.009
11				8	6					0.336
12					1					0.147
(3) Aymara population										
HUMTH01										
Allele										Frequency
	6	7	9	10						
6	5	32	2	10						0.209
7		51	1	24						0.616
9			0	0						0.012
10				4						0.163
HUMVWA31A										
Allele										Frequency
	14	15	16	17	18	19	20			
14	0	1	3	0	0	0	0			0.017
15		0	7	4	0	0	1			0.054
16			17	40	6	4	0			0.392
17				24	8	5	0			0.438
18					0	0	0			0.058
19						0	0			0.038
20							0			0.004
HUMCSF1PO										
Allele										Frequency
	9	10	11	12	13	14				
9	0	1	0	0	0	0				0.010
10		2	3	13	1	1				0.240
11			8	9	2	1				0.323
12				6	1	0				0.365
13					0	0				0.042
14						0				0.021
HUMTPOX										
Allele										Frequency
	8	9	11	12						
8	19	1	13	9						0.622
9		0	1	0						0.020
11			1	3						0.194
12				2						0.163

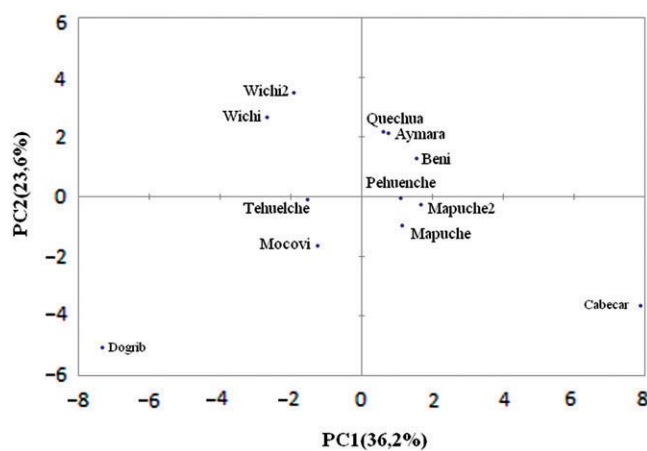


Figure 2. Principal component analysis obtained from HUMTH01 and HUMCSF1PO frequencies of the populations studied by the authors, adding other representative Native American groups. Aymara, present study; Beni, present study; Cabecar, Deka et al. (1999); Dogrib, Deka et al. (1999); Mapuche, Tourret et al. (1999); Mapuche2, Sala et al. (1998); Mocovi, Tourret et al. (1999); Pehuenche, Deka et al. (1999); Quechua, present study; Tehuenche, Sala et al. (1998); Wichi, Tourret et al. (1999); Wichi2, Sala et al. (1998).

Table II. Comparison of heterozygosity (H), power of discrimination (PD), chance of exclusion (CE) and p -value for Hardy-Weinberg equilibrium test (HWE) for populations reported in the present study and for each STR.

STR	Population	H	PD	CE	HWE
HUMTH01	Beni	0.4690	0.6813	0.2383	0.0037
	Quechua	0.5556	0.7623	0.3248	0.2264
	Aymara	0.5349	0.7388	0.3015	0.5597
HUMVWA31A	Beni	0.5574	0.7897	0.3731	0.1325
	Quechua	0.6759	0.8933	0.5188	0.0879
	Aymara	0.6583	0.8137	0.3869	0.4604
HUMCSF1PO	Beni	0.6957	0.8816	0.4984	0.0756
	Quechua	0.8000	0.7835	0.3904	0.2808
	Aymara	0.6667	0.8385	0.4429	0.1635
HUMTPOX	Beni	0.5213	0.8042	0.3449	0.0866
	Quechua	0.5517	0.7830	0.3373	0.1699
	Aymara	0.5510	0.7389	0.3057	0.7641

Figure 2 shows a PCA performed with the allelic frequencies of the whole Native American available data including Aymara, Quechua and Beni data populations. The first principal component was responsible for the 36.2% of variance and discriminated clearly all the South American groups from Dogrib and Cabecar populations. The second principal component explained the 23.6% of the observed variance. Aymara, Quechua and Beni populations joined with the rest of South American groups. We can observe in this cluster a closer proximity among the three studied populations, suggesting a certain degree of genetic flow among them, as was observed by the authors in a previous work using mtDNA data (Bert et al. 2001).

Statistical parameters of genetic variability such as heterozygosity and HWE test are depicted in Table II. All the systems show heterozygosity values ranging between 0.469 and 0.800. The values of HWE were calculated based on the expected and observed number of heterozygotes. All loci were found to be in HWE except for HUMTH01 in the Beni population.

Acknowledgements

This study was funded by the Spanish DGICYT Project PB97-925. We are grateful to all populations who collaborated in the present study, to Dr Castro of San Ignacio Hospital, Dra. Greet Diltiens and Dra. Roser Montagut for their cooperation in the re-collection of samples. We are also grateful to Dr J. Cerdà of the Laboratorio de Biología 'San Calixto' from La Paz, Bolivia, for his help.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A, Turbón D. 2001. Major mitochondrial DNA haplotype heterogeneity in highland and lowland Amerindian populations from Bolivia. *Hum Biol* 73:1–16.
- Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A, Turbón D. 2004. Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracare Amerindian populations from Bolivia lowlands. *Ann Hum Biol* 31:9–28.
- Cerrón-Palomino R. 1987. Unidad y diferenciación lingüística en el mundo andino. *Lexis*, 11:1, pp. 71-010-t. and In: López, LE, editor. *Pesquisas en lingüística andina*. Lima: Gráfica Bellido 11:121–152.
- Corella A, Bert F, Gené M, Pérez-Pérez A, Turbón D. 2007. Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian populations living in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Mosen, Aymara and Quechua. *Ann Hum Biol* 34:34–35.
- Deka R, Shriver MD, Yu LM, Mueller Heidreich E, Jin L, Zhong Y, McGarvey ST, Swarup Agarwal S, Bunker CH, Miki T, et al. 1999. Genetic variation at twenty-three microsatellite loci in sixteen human populations. *J Genet* 78:99–121.
- DNA recommendations. 1992. Report concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms. *Int J Legal Med* 105:63–64.
- DNA recommendations. 1994. Report concerning further recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics regarding PCR-based-polymorphisms in STR systems. *Int J Legal Med* 107:159–160.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12:241–253.
- Gené M, Carracedo A, Huguet E, Pérez-Pérez A, Moreno P. 1998. Population genetics of the D12S391, CSF1PO and TPOX loci in Catalonia (Northeast Spain). *Int J Legal Med* 111:52–54.
- Guo S, Thompson E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372.
- Huang EN, Schumm J, Budowle B. 1995. Chinese population data on three tetrameric short tandem repeat loci – HUMTH01, CSF1PO and TPOX – derived using multiplex PCR and manual typing. *Forensic Sci Int* 71:131–136.
- Kimpton C, Walton AP, Gill PA. 1992. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the VWA gene. *Hum Mol Genet* 1:287.
- Möller A, Wiegand P, Gruschow C, Seuchter SA, Baur MP, Brinkmann B. 1994. Population data and forensic efficiency values for the STR systems HUMVWA, HUMMBP and HUMFABP. *Int J Legal Med* 106:183–189.

- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249.
- Ruhlen M. 1991. A guide to the World's languages, volume 1: classification. Stanford, CA: Stanford University Press.
- Sala A, Penacino G, Corach D. 1998. Comparison of allele frequencies of eight STR loci from Argentinian Amerindian and European populations. *Hum Biol* 70:937–947.
- Tourret N, López Gamelo J, Vidal-Rioja L. 1999. Allele frequencies of six STR loci in Argentine populations. *J Forensic Sci* 44:1265–1269.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506–513.
- Wiegand P, Budowle B, Rand S, Brinkmann B. 1993. Forensic validation of the STR systems SE33 and TC11. *Int J Legal Med* 105:315–320.

3.9

Legal Medicine XXX (2008) XXX–XXX



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Legal Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/legalmed



Announcement of Population Data

Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs included in AmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit in a multi ethnical population from El Beni Department (North Bolivia)

Mirian Tirado^a, Ana María López-Parra^a, Carlos Baeza^a, Francesc Bert^b, Albert Corella^b, Alejandro Pérez-Pérez^b, Daniel Turbón^b, Eduardo Arroyo-Pardo^{a,*}

^aDpto. Toxicología y Legislación Sanitaria, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain
^bUnidad de Antropología, Dpto Biología Animal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Spain

El Departamento del Beni es una región localizada en los llanos bolivianos, donde se han realizado pocos estudios de las poblaciones indígenas que allí viven, la zona es interesante desde diferentes puntos de vista: Una gran multietnicidad, una marginalidad geográfica y una historia demográfica única. El número de habitantes autóctonos se estima alrededor 54,000 la mayoría de ellos en pequeños asentamientos, algunas comunidades están formadas por población de origen andino colona. La región del Beni ha sido poblada por distintos grupos humanos desde tiempos pre-cerámicos.

Se recogieron muestras de 87 individuos de las etnias Aymará n=2, Borjana n=1, Camba n= 2, Chimane n=10, Ignaciana n=11, Mojeña n=5, Tacana n=1, Trinitaria n=38, Yuracaré n=7.

Los polimorfismos del cromosoma Y se amplificaron con el Kit de PCR AmpFISTR, los alelos fueron asignados utilizando la cadena *leader* del fabricante y siguiendo las recomendaciones de la Comisión del ISFG (Gusmão et al. 2006).

La distribución de haplotipos se presenta en la Tabla 1 (ver artículo) y las frecuencias alélicas en la Tabla 2 (ver artículo).

Las frecuencias haplotípicas y la diversidad genética se estimó utilizando el programa Arlequín ver 3.01. Para la estimación de la diversidad haplotípica, DYS389i fue substraído de DYS389ii. Una duplicación en DYS389i también fue excluida en todos los cálculos del estudio.

Se obtuvieron 56 haplotipos diferentes del total de 87 individuos, 13 de los cuales se repitieron al menos dos veces, el resto se presentó una única vez.

La diversidad haplotípica hallada fue de $0,9808 \pm 0,0067$. Se halló un individuo Yuracaré con la duplicación DYS389i (12/13).

Se construyó una base de datos (con el número mínimo de haplotipos exceptuando DYS385 y con DYS389i eliminado de DYS389ii) con un total de 10 muestras de individuos sudamericanos y nuestras muestras. Se calculó la Rst utilizando el programa Arlequín ver 3.01, la distancia genética menor se halló cuando se comparo nuestra muestra con la de Perú (Rst = 0,01875), valores de Rst superiores a 0,20 fueron observados en todas las comparaciones. Todas las distancias entre la población del Beni con otras poblaciones fueron significativas. Se llevó a cabo un análisis *Multidimensional Scaling* (MDS) con las distancias Rst utilizando el programa SPSS ver 15.0. Las poblaciones disponibles incluidas en el presente estudio fueron Norte Brasil (BRA_N), Brasil Nordeste (BRA_NE), Brasil Central Oeste (BRA_CW), Brasil Sudeste (BRA_SE), Brasil Sur (BRA_S), Argentina Córdoba (ARG_CO), Perú (PER), Bolivia Mojeños (BOL_MOX), Bolivia altiplano (BOL_H) y Bolivia Llanos (BOL_L), Bolivia Beni (BOL_BENI).

La población del Beni mostró una remarcable diferenciación respecto otras poblaciones más o menos cercanas. En general, las poblaciones de Bolivia mostraban una clara diferenciación si se comparan con el resto de poblaciones de zonas limítrofes, las muestras del Beni son las mas similares de toda la serie.

Los resultados del estudio indican una diferenciación genética estadísticamente significativa entre las poblaciones de Bolivia. La información genética sugiere que procesos evolutivos tales como deriva genética, selección natural y mezcla genética han modelado la historia demográfica de estos grupos humanos.

Los datos pueden encontrarse para su comparación con la mayoría de bases de datos: Y-STR Haplotype Reference Databases (www.yhrd.org), Yfiler database (www.appliedbiosystems.com/yfilerdatabase), Promega PowerPlex® Y System (www.promega.com/techserv/tools/pplexy/pplexy.asp) ReliaGene Database (www.reliagene.com)



Announcement of Population Data

Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs included in AmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit in a multi ethnical population from El Beni Department (North Bolivia)

Mirian Tirado^a, Ana María López-Parra^a, Carlos Baeza^a, Francesc Bert^b, Alfons Corella^b, Alejandro Pérez-Pérez^b, Daniel Turbón^b, Eduardo Arroyo-Pardo^{a,*}

^aDpto. Toxicología y Legislación Sanitaria, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain

^bUnidad de Antropología, Dpto Biología Animal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 June 2008

Accepted 10 September 2008

Available online 29 October 2008

Keywords:

Y-STR

AmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit

Y-chromosome

Population genetics

El Beni

Bolivia

ABSTRACT

Seventeen Y-STRs included in AmpFISTR Yfiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, USA) were studied in males from a multi ethnical population from El Beni Department (North Bolivia). Haplotypic and allelic frequencies were reported. Comparison of El Beni population with other samples from the region was carried out through Multidimensional Scalling over Rst distances matrix.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Population: Beni Department is a region located in the Bolivian lowlands. Few studies of indigenous peoples living there have been carried out. This area is particularly interesting from many points of view: the great multi-ethnicity of the human populations that live there, their geographic marginality and unique demographic history. The number of Native American is estimated around 54,000 people, most of them living in small communities with Amazonian traits but there are also some Andean groups arrived as colonizers. This land has been occupied by distinct human groups since pre-ceramic periods, giving origin to the present population. A representative sample of them is presented in this study. Blood samples were obtained from 87 apparently healthy volunteer donors from El Beni Department, North Bolivia. Ethnical composition of the sample comprised 2 Aymara, 1 Borjano, 2 Camba, 10 Chimane, 11 Ignaciano, 10 Mojeño, 5 Movima, 1 Tacana, 38 Trinitario and 7 Yuracare

Extraction: DNA extraction was carried out from peripheral blood using a standard Phenol-chloroform method.

PCR and typing: Y-STRs polymorphisms were amplified with AmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's recommendations [1]. Amplifications were run in an ABI 3730 Sequencer (Applied Biosystems) and alleles were assigned using manufacturer's ladder and according to recommendations from DNA Commission of the ISFG (Gusmão et al. [2]).

Results: Haplotype distribution is presented in Table 1 and allelic frequencies are shown in Table 2.

Analysis of data: Haplotype frequency and diversity were estimated using Arlequin statistical package ver. 3 [3]. For haplotype diversity estimate, DYS389i was subtracted from DYS389ii. A duplication in DYS389i was also excluded in all calculations. Fifty six different haplotypes were obtained out from the 87 individuals. Thirteen haplotypes were repeated at least twice and the rest of them were unique. The haplotype diversity for this population was 0.9808 ± 0.0067 . We found an individual with a duplication in DYS389i (12/13) in a Yuracare individual.

A database of Y-STRs frequencies (minimum haplotype except DYS385 and with DYS389i was subtracted from DYS389ii) was constructed with a total of 10 South American samples plus our population. Rst were calculated using Arlequin ver 3.01. The smallest genetic distances Rst between Bolivia and the other populations were obtained against Peru (Rst = 0.01875). Rst

* Corresponding author. Address: Dep. Toxicology and Health Legislation, Laboratory of Forensic and Population, Complutense University of Madrid, 28040-Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3941576; fax: +34 91 3941606.

E-mail address: earroyop@med.ucm.es (E. Arroyo-Pardo).

Table 1
Observed Y chromosome haplotype distribution in a multiethnic population of El Beni province (Bolivia)

Hp	N	DYS 19	DYS 389i	DYS 389ii	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 385I	DYS 385II	DYS 437	DYS 438	DYS 439	GATA H4	DYS 448	GATA C4	DYS 458	DYS 456	Ethnic origin
H1	1	13	12	29	23	10	13	13	14	16	14	11	12	11	19	23	15	15	1A
H2	1	13	12	29	23	11	14	12	14	16	14	11	12	12	20	22	17	15	1MJ
H3	1	13	12	29	24	10	13	13	14	14	14	11	12	11	21	22	16	16	1T
H4	1	13	12	29	24	10	13	13	14	15	14	11	12	11	19	22	15	15	1C
H5	9	13	12	29	24	10	13	13	14	17	14	11	12	11	19	22	15	15	8C, 1Y
H6	1	13	12	29	24	10	14	13	14	15	14	11	12	13	21	22	16	15	1T
H7	1	13	12	29	24	10	15	12	14	14	14	11	13	12	20	23	19	16	1T
H8	1	13	12	30	24	10	14	14	14	15	14	10	12	12	20	22	16	15	1C
H9	2	13	13	29	23	10	14	13	14	14	14	11	11	11	19	22	17	16	1T, 1B
H10	3	13	13	29	24	10	13	13	14	18	14	11	12	12	20	23	16	15	3 MJ
H11	2	13	13	29	24	10	14	12	14	15	14	11	10	11	19	22	14	17	2 MJ
H12	2	13	13	29	24	9	14	13	15	16	14	11	10	12	19	22	15	17	2T
H13	2	13	13	29	25	9	14	13	15	16	14	11	11	12	19	23	15	15	1T, 1MJ
H14	1	13	13	29	25	9	14	13	16	16	14	11	11	12	19	23	15	15	1T
H15	1	13	13	30	22	10	16	13	14	17	14	11	13	12	18	24	15	15	1T
H16	4	13	13	30	23	10	14	13	14	16	15	11	12	11	21	22	17	15	3T, 1MJ
H17	2	13	13	30	23	10	15	13	12	17	14	10	13	12	19	22	16	15	2T
H18	1	13	13	30	23	10	16	13	12	17	14	10	13	12	19	22	16	15	1T
H19	1	13	13	30	23	11	14	13	13	16	15	11	12	11	21	22	16	15	1I
H20	1	13	13	30	23	11	14	13	14	15	14	11	12	11	21	22	16	15	1T
H21	4	13	13	30	23	11	14	13	15	18	15	11	11	11	20	22	18	15	3T, 1MV
H22	1	13	13	30	24	9	14	13	14	17	14	10	12	12	19	22	16	15	1T
H23	1	13	13	31	23	11	14	13	14	16	15	11	12	11	21	22	17	15	1I
H24	1	13	13	31	24	10	14	13	14	17	14	10	12	12	20	22	16	15	1I
H25	2	13	13	31	25	11	14	13	14	15	15	11	12	13	20	24	18	15	2T
H26	1	13	14	27	23	10	14	14	13	16	14	10	12	12	19	22	16	15	1MJ
H27	1	13	14	30	23	12	14	13	14	17	14	10	11	13	20	23	19	14	1T
H28	1	13	14	30	23	13	14	13	14	17	14	10	11	13	20	23	18	14	1T
H29	1	13	14	30	23	13	14	13	14	17	14	10	11	13	20	23	19	14	1I
H30	1	13	14	30	24	10	14	12	14	15	14	11	10	12	19	22	14	18	1T
H31	1	13	14	31	23	10	14	13	14	16	14	10	11	12	19	22	18	15	1A
H32	1	13	14	31	23	10	14	15	13	17	14	10	12	12	19	22	15	16	1T
H33	2	13	14	31	24	10	14	14	13	17	14	10	12	12	19	23	16	15	2T
H34	2	13	14	32	23	10	14	14	13	17	14	10	12	12	19	22	16	16	2T
H35	2	13	14	32	23	10	14	14	13	17	14	10	12	12	19	22	16	15	1T, 1MJ
H36	4	14	12	30	23	10	15	14	13	16	14	11	11	12	21	22	17	15	4Y
H37	1	14	12	30	23	10	15	14	13	16	14	11	12	12	21	22	17	15	1Y
H38	3	14	12	30	24	10	14	13	14	15	14	11	13	11	21	19	17	16	3T
H39	1	14	12/13	30	23	10	15	14	13	16	14	11	11	12	21	22	17	15	1Y
H40	2	14	13	28	24	11	13	13	11	14	15	12	12	12	19	23	16	16	2MV
H41	1	14	13	29	23	10	11	12	13	16	14	9	10	11	20	21	15	16	1T
H42	1	14	13	29	24	11	13	13	11	14	15	12	11	11	19	23	18	15	1MV
H43	1	14	13	29	24	11	13	13	11	14	15	12	11	12	19	24	17	17	1CB
H44	1	14	13	29	24	11	13	13	12	14	16	12	11	11	19	23	18	15	1I
H45	1	14	13	29	24	11	13	13	12	14	16	12	12	11	19	23	18	15	1I
H46	1	14	13	30	24	10	14	13	13	16	14	12	10	12	19	22	15	15	1T
H47	1	14	13	30	24	10	14	13	14	15	14	11	11	12	20	22	17	17	1I
H48	1	14	13	30	24	10	15	13	15	16	14	11	10	12	19	22	15	18	1I
H49	1	14	13	30	24	11	11	13	11	14	15	12	12	12	19	23	16	17	1TA
H50	1	14	13	30	24	11	13	13	11	14	15	12	12	12	19	23	16	17	1T
H51	1	14	14	29	24	10	14	13	14	18	14	9	11	10	20	21	17	15	1MV
H52	1	14	14	30	24	11	13	13	11	14	14	12	12	11	18	23	17	17	1I
H53	1	15	12	29	21	10	11	14	13	16	16	10	11	10	22	21	17	15	1T
H54	1	15	13	30	21	10	11	13	15	15	14	11	12	12	20	22	17	16	1I
H55	1	15	13	30	25	10	11	13	12	14	14	11	10	13	20	23	15	15	1CB
H56	1	15	14	33	24	11	11	13	11	12	14	10	13	12	21	17	16	14	1I

A, Aymara; B, Borjano; C, Chimane; CB, Camba; I, Ignacio; MJ: Mojeño; MV, Movima; TA: Tacana; T, Trinitario; Y, Yurakare.

always above 0.200 were observed for all other comparisons. All distances between Bolivian and the other populations were significant, including those others with Bolivian population. Multi-dimensional Scaling (MDS) over Rst distances was carried out through SPSS ver 15.0 (Fig. 1). Available published populations included in the present study were: Brazil North (BRA_N), Brazil Northeast (BRA_NE), Brazil Central west (BRA_CW), Brazil Southeast (BRA_SE), Brazil South (BRA_S) [4]; Argentina Cordoba (ARG_CO) [5], Peru (PER) [6]; Bolivia Moxeños (BOL_MOX) [7]; Bolivia High altitude (BOL_H) and Bolivia Low altitude (BOL_L) [8] and El Beni, Bolivia (BOL_BENI, present study). In general,

Bolivian populations showed a remarkable differentiation in comparison to other surrounding populations, El Beni sample being the most similar to the rest of series.

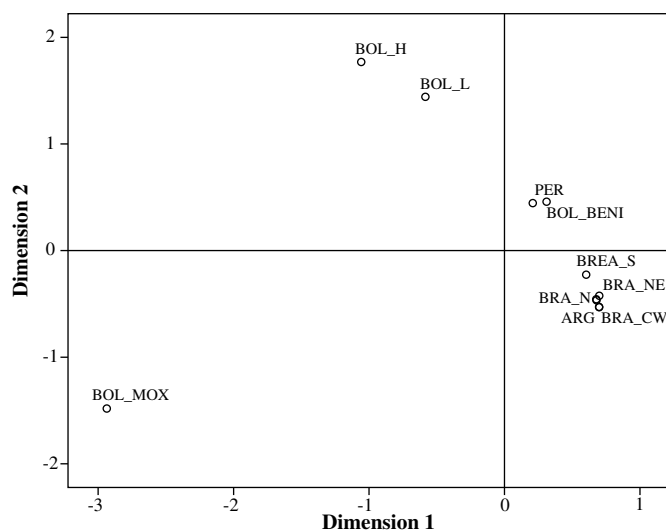
The results of this study demonstrate a strong and statistically significant genetic differentiation between different populations from Bolivia. Genetic information suggests that evolutionary processes, such as genetic drift, natural selection and genetic admixture have formed the history of these populations.

Also, our data allow comparison with the most common databases: Y-STR Haplotype Reference Databases (www.yhrd.org), Yfiler database (www.appliedbiosystems.com/yfilerdatabase)

Table 2

Allelic frequencies of Yfiler genetic markers and genotype distribution for DYS385

Alleles	DYS19	DYS389i	DYS389ii	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	DYS437	DYS438	DYS439	GATAH4.1	DYS448	GATAC4	DYS458	DYS456	Genotype	DYS385
9					0.069				0.023							11-12	0.011
10					0.667				0.230	0.103	0.023					11-14	0.080
11					0.230	0.069			0.632	0.276	0.402					12-14	0.034
12		0.287			0.011	0.069			0.115	0.517	0.494					12-17	0.034
13	0.690	0.517			0.023	0.264	0.747			0.103	0.080					13-16	0.126
14	0.264	0.184				0.529	0.172	0.759						0.034	0.046	13-17	0.080
15	0.046					0.115	0.011	0.207						0.253	0.667	14-14	0.046
16						0.023		0.034						0.287	0.161	14-15	0.149
17													0.011	0.264	0.103	14-16	0.092
18												0.023		0.126	0.023	14-17	0.172
19												0.506	0.034	0.034		14-18	0.046
20												0.241				15-15	0.011
21				0.023								0.218	0.034			15-16	0.057
22				0.011								0.011	0.621			15-18	0.046
23				0.402										0.253		16-16	0.011
24				0.494										0.046			
25				0.069													
26																	
27			0.011														
28			0.023														
29			0.391														
30			0.425														
31			0.092														
32			0.046														
33			0.011														
12/13		0.011															

**Fig. 1.** Plot from MDS analysis over Rst values from Y-STR haplotypes. Stress value: 0.02462. See text for population codes.

Promega PowerPlex® Y System (www.promega.com/techserv/tools/pplexy/pplexy.asp) or ReliaGene Database (www.reliagene.com).

References

- [1] Applied Biosystems. AmpFISTR Yfiler™ PCR Amplification Kit user's manual. Foster City, CA, USA.
- [2] Gusmão L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci Int* 2006;157:187–97.
- [3] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.001. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva, 2000.
- [4] Grattapaglia D, Kalupniek S, Guimarães CS, Ribeiro MA, Diener PS, Soares CN. Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. *Forensic Sci Int* 2005;149:99–107.
- [5] Fondevila M, Jaime JC, Salas A, Lareu MV, Carracedo A. Y-chromosome STR haplotypes in Córdoba (Argentina). *Forensic Sci Int* 2003;137:217–20.
- [6] Iannaccone GC, Yhossef Tito R, Wenceslao Lopez P, Medina ME, Lizarraga B. Y-chromosomal haplotypes for the PowerPlex Y for twelve STRs in a Peruvian population sample. *J Forensic Sci* 2005;50(1):1–4.
- [7] Rocabado O, Penacino G, Sala A, Revollo S, Marino M, Polisecki E, et al. Análisis genético poblacional de 9 Y-STRs en un grupo étnico de Bolivia. *Biofarbo* 2003;XI:49–52.
- [8] Lee J, Ewis AA, Hurlles ME, Kashiwazaki H, Shinka T, Nakahori Y. Y chromosomal STRs haplotypes in two populations from Bolivia. *Legal Med* 2007;9:43–7.

3.10

Original Manuscript in preparation

PIEDMONT AND LLANOS DE MOXOS POPULATIONS LIVING IN THE BENI DEPARTMENT (BOLIVIA) CHARACTERIZED BY HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO AND HUMTPOX POLYMORPHISMS

Francesc Bert,¹ Alfons Corella,¹ Alejandro Pérez-Pérez,¹ Manel Gené,² and Daniel Turbón.¹

¹Secció Antropologia, Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. ²Departament de Medicina Legal, Laboratori de Genètica Forense, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

El presente estudio presenta las frecuencias alélicas de los *short tandem repeats* (STR's) HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO y HUMTPOX de poblaciones del Departamento del Beni: Quechua, Aymará, Ignaciano, Trinitario, Movima, Yuracaré, Chimane y Mositén. Dichas poblaciones, si bien viven en áreas específicas de la región Andina, del Piedemonte o de los Llanos, sobreponen sus áreas originales entre sí desde tiempos históricos. Se examinaron los niveles de variación genética entre las 8 poblaciones y la utilidad de los marcadores estudiados en la elaboración de tests de paternidad.

Para determinar la homogeneidad genética de las poblaciones del Beni se compararon con otras poblaciones con diferentes grados de proximidad geográfica.

El presente trabajo incluye también un exhaustivo estudio de las frecuencias de los haplogrupos del ADNmt utilizando mapas de isofrecuencia.

Las muestras biológicas consistieron en bulbos pilosos de cabello de 386 individuos no emparentados de ambos sexos. El ADN se extrajo con CheelexTM 100 utilizando el método descrito por Walsh et al (1991).

A partir de las frecuencias de cada alelo para todos los loci se calculó la heterocigosidad observada, la posible divergencia del equilibrio Hardy-Weinberg utilizando el test exacto de Guo y Thompson (1992), el desequilibrio de ligamiento, el poder de discriminación y el valor apriorístico de exclusión con el programa GENEPOP.

Se realizó también un análisis de componentes principales (PCA) con las frecuencias obtenidas del presente estudio y el conjunto de poblaciones de otras regiones del Mundo, de la misma forma se elaboró un árbol UPGMA basado en las distancias genéticas de Reynolds et al. (1983) utilizando el programa informático PHYLIP (Felsenstein 1993).

Los mapas de isofrecuencia de las frecuencias de los haplogrupos del ADNmt se generaron utilizando el método Kriging de interpolación, éste método utiliza las medias estadísticas de las frecuencias de los haplogrupos con relación a una distribución geográfica. El programa utilizado fue Surfer 8 (*Golden Software*). Se añadieron las frecuencias de los haplogrupos de 49 grupos Amerindios de Sudamérica.

En los resultados se observó que el locus HUMTH01 exhibía 6 alelos, dos de ellos, los de 6 y 7 repeticiones con altas frecuencias. El locus HUMVWA31A mostró un total de 8 alelos pero sólo los de 15, 16 y 17 repeticiones fueron relativamente frecuentes.

El locus HUMCSF1PO también presentaba 6 alelos y la repeticiones 10, 11 y 12 fueron las más frecuentes. El locus HUMTPOX presentó 5 alelos y las frecuencias más altas fueron las de 8 y 11 repeticiones.

Los valores de heterozigosidad estaban entre 0,286 y 0,909. Todos los loci estaban en equilibrio Hardy-Weinberg excepto los locus HUMVWA31A y HUMTPOX en la población Mosestén y el locus HUMTH01 en la población beniana.

El análisis de componentes principales, el 42,3 % de la varianza de la primera componente principal separaba claramente la población Quechua y Aymará del resto de poblaciones. La segunda componente principal fue responsable del 28,5 % de la varianza y separó las etnias del Piedemonte de habla Mosestén (Chimane y Mosestén) de las poblaciones que viven en los Llanos (Ignaciano, Trinitario, Yuracaré y Movima).

El árbol filogenético UPGMA realizado con las frecuencias de los locus HUMTH01 y HUMCSF1PO de las poblaciones estudiadas y otras poblaciones del Mundo mostró la existencia de dos *clusters* o agrupaciones principales, uno formado exclusivamente por poblaciones Amerindias y otro compuesto por el resto de poblaciones del resto de los continentes. La proximidad lingüística y cultural en el caso de las poblaciones de Bolivia parece evidente en el árbol UPGMA.

Los mapas de isofrecuencia de los haplogrupos A, B, C y D del ADN mitocondrial indican una gran afinidad con las áreas de distribución lingüística en Sudamérica y según cada caso con las posibles expansiones de las poblaciones Chibcha (Haplogrupo A), Andina y Pano (Haplogrupo B), Arawak (Haplogrupo C) y Arawak y Tupí-Guaraní (Haplogrupo D).

Los árboles filogenéticos derivados de las distancias genéticas tienden a agrupar las distintas poblaciones por proximidad geográfica y/o afinidad lingüística, el caso del *cluster* de las poblaciones del Piedemonte se puede explicar por flujo génico entre dichas poblaciones y lo mismo se puede deducir de las poblaciones de los Llanos. El caso de la

afinidad de Quechuas y Aymarás se podría explicar por la proximidad cultural y las marcadas estructuras sociales que actuaron durante siglos en los Andes permitiendo elevados niveles demográficos, con ésta situación demográfica tuvo que existir un elevado flujo génico en todo el territorio que tendería a homogenizar genéticamente a las poblaciones en comparación a otras ecoregiones de Sud América. (Stanish 2001).

PIEDMONT AND LLANOS DE MOXOS POPULATIONS LIVING IN THE BENI DEPARTMENT (BOLIVIA) CHARACTERIZED BY HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO AND HUMTPOX POLYMORPHISMS

Francesc Bert,¹ Alfons Corella,¹ Alejandro Pérez-Pérez,¹ Manel Gené,² and Daniel Turbón.¹

¹Secció Antropologia, Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Avinguda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. ²Departament de Medicina Legal, Laboratori de Genètica Forense, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Send proofs to: Daniel Turbón
Secc. Antropologia, Dpto. Biologia Animal
Fac. Biologia, Universitat de Barcelona
Avda. Diagonal 645
Barcelona 08028, Spain

This report presents allele frequency data of the short tandem repeat (STR) loci HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX for autochthonous Amerindian populations living in the Beni Department of Bolivia. These related populations are quechua, aymara, ignaciano, trinitario, movima, yuracare, chimane and mosetene, all living in specific although sometimes overlapping areas, that extend from the Andean habitat to the lowland Llanos de Moxos savannah passing through the Piedmont hills. The level of variation among and within all eight populations and the usefulness of these loci for paternity and identification testing were also examined. Furthermore, to test the genetic homogeneity of the current Beni populations, they were compared with other geographically near and distant global populations. This report include a new study of South Amerindian mtDNA haplogroups using isofrequency maps. The present work completes a previous study of the cited populations where mtDNA haplogroup and HVRI data was included (Bert et al. 2001).

KEY WORDS: aymara; quechua; chimane; moseten; ignaciano; trinitario; movima; yuracare; mtDNA, HUMTH01; HUMVWA31A; HUMCSF1PO; HUMTPOX

In previous years many studies have been made based on the genetic characterization of Amerindian populations. Different methodologies are useful to assess the genetic relationships and the evolutionary data of these groups, as well as for forensic objectives. STR loci are widely used for genetic characterization because of the great amount of information they give. Nevertheless, the number of these studies is still sparse in some areas, such as Bolivia.

From a geographical point of view Bolivia is a country shaped by two major units: the highland territories of the Andean mountains and the lowlands of the Amazonian basin. The Beni is a north-eastern Department in the lowlands, between the forested slopes of the Andes and the Brazilian border (Figure 1). Within the Beni Department we can clearly differentiate two major geographical areas: the Piedmont and the Plains. The Piedmont is formed by parallel hills ranging between 250 and 2,500 meters in height and is the transition zone between the valleys of the Andean chain and the tropical Amazonia, its predominant ecosystem is tropical forest shifting to sub-tropical. The Plains are nowadays known as Llanos de Moxos. This area occupies the central region of the Beni river basin. Its ground is basically flat ranging between 120 and 250 meters in elevation and some zones are seasonally flooded. Its predominant ecosystem comprises seasonal savannas, wetlands, and such forest formations as gallery forests and island forests. Climate is characterized by alternating dry and rainy seasons. During the rainy period the water can cover 60% of the land for several months. All these facts affect ecological dynamics and the distribution of resources greatly affecting human settlement.

From a demographic perspective, the differences amongst populations living in Beni Department have been generated by a continuous interaction between ecology, economy, and ethnicity. The human settlement pattern of this region is based on dispersed communities of reduced size. Sometimes all the individuals of a community belong to one ethnic group but in other cases individuals of different groups coexist. Most of the Amerindian people living in the Beni Department today belong to ethnic groups of reduced population sizes with Amazonian traits, living exclusively in this geographical area. This is the case of the groups ignaciano, trinitario, movima, yuracare, chimane and moseten reported in this study. We referred the results obtained to this set of populations as 'Beni populations'. Nevertheless we can also find Amerindians living in the Beni that belong to the groups quechua and aymara who are populations with different traits and whose results we will consider separately.

Taking into account south Amerindian populations, quechua and aymara represent the major social and linguistic groups of all the countries in an Andean context. The quechua constitute the main population in the Andean region, and their language is one of the most spoken native languages in America. The quechua is spoken in seven countries, and it cannot be considered exclusively an Andean language since it is widely used also in the Amazonian region. quechua speakers include 4.4 million inhabitants in Peru; 2.2 in Ecuador; 1.6 in Bolivia; 0.12 in Argentina and over 5,000 speakers in Colombia, Brazil and Chile (Cerron-Palomino, 1987).

aymara is constituted of around 2.2 million people living in Bolivia and Peru, particularly around Titicaca lake, most of them speaking aymara language. aymara and quechua languages belong to the Andean family stock. The origin and the relationship of these groups are uncertain but the most likely theory refers to a common origin somewhere on the Peruvian coast. The presence of both Andean groups in the Beni was more intense from the 1950s when they arrived as colonizers.

The ignaciano and trinitario belongs to a group of populations called collectively 'mojeños', which is a geographical term referred to the Llanos de Moxos where they live. These set of populations speak different languages related to the widespread Arawakan linguistic stock. In 1696, Jesuits counted 19,760 Arawakan-speaking people living in Jesuit Reductions (an aggregation of populations joined for religious and cultural education). They described more than 15 ethnic groups in a small area, all them speaking distinct languages. Since the expulsion of the Jesuits in 1767 the population has been greatly reduced. The locations of the San Ignacio and Trinidad missions are now occupied by the villages of San Ignacio and Trinidad where these Indians live. The estimated population size at present is around 6,000 for Ignaciano people and 9,000 for Trinitario. Both ethnic groups practice a rudimentary agriculture and speak their own language recognizing each other as speakers of another closely related but different language.

Around 6,000 movima Indians live today in several communities placed near the city of Santa Ana de Yacuma. No more than one thousand still speak the movima language, an unclassified language belonging to the Equatorial-Tucanoan subgroup of the Amerind language stock (Ruhlen, 1991). The history of this group is poorly known. Their presence in the Llanos de Moxos is reported by the Jesuit missionaries in the last quarter of the 17th century. They inhabited minor rivers and open savannah at this time with an agricultural practice less sophisticated than 'mojeños'. They were also 'reduced' by Jesuits into missions formed exclusively by inhabitants of this ethnic group.

Yuracare population was less structured than 'mojeños' and movima with no agricultural practice and a hunter-gatherer way of life. The emphasis to place these kind of groups into the 'reductions' system was less, probably for different reasons: small population sizes, major differences in their cultural system and dispersion of their communities. Their population is today estimated at 3,000 people.

The chimane and moseten populations compose the Mosetenean linguistic family, a Macro-Panoan language belonging to the Ge-Pano stock, and we can refer to them in our results as Mosetenean when they are considered together. The chimane population of 5,000 lives near the Maniqui River. The chimane settlements are made up of a few houses where nuclear families lives. The chimane are semi-nomads and make seasonal movements in order to find their natural resources. The economy of chimane people is based on hunting, fishing and an elemental agricultural system of 'roza-tumba-quema'.

The moseten population live in the foothills of the Andes, in the Upper Beni River and their territory is connected with that of the chimane. Their population is estimated at 1,200 individuals. The moseten practice the rice, yucca, cocoa agriculture but they practice also subsistence activities like hunting, fishing and gathering.

The natural environments coexisting in the Beni area allow different options of subsistence and in turn these economic activities have modified the environment. Viewed as a regional system of exchange these areas have developed a differentiated political-economic structure, in which the geographical positions of specific groups have contributed to shape the various roles that they came to play. Many factors such as geography, linguistics and economy have determined the composition of the native groups that today live in this area. The purpose of this study is to contribute to genetically characterize some Amerindian groups that today live in the Beni Department using HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX STR loci.

Material and Methods

Preparation of DNA

Biological samples consisted of informed consent hair-pulls with bulb from 386 unrelated individuals (both sexes) from quechua, aymara, ignaciano, trinitario, yucarare, movima, chimane and moseten groups living in the Beni Department. DNA was extracted with Chelex 100 using the method described by Walsh et al. (1991).

PCR amplification and typing

Amplification of HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX tetrameric short tandem repeat (STR) loci was achieved using the primers described by Edwards et al. (1992), Kimpton et al. (1992) and Huang et al. (1995). Forward primers were labelled with fluorescein amidite at 5' position.

Singleplex PCR reaction assays were carried out as described by Wiegand et al. (1993) and Möller et al. (1994) for HUMTH01 and HUMVWA31A loci respectively. Duplex PCR reactions were performed for HUMCSF1PO and HUMTPOX loci following Gené et al. (1998) method conditions. All PCR amplifications were performed together with negative and positive control samples.

Separation was carried out on 6% (w/v acrylamide bisacrylamide) polyacrylamide denaturing high-performance DNA sequencing gels (Ready Mix Gel ALF grade, Pharmacia). All fresh PCR products were typed twice. Electrophoresis was carried out on the automated Laser Fluorescent (ALF) DNA Sequencer (Pharmacia) at 1450 V, 38 mA, 45 W and 50°C with laser power at 3 mW for 220 min.

Amplified DNA was mixed with internal fluorescent labelled size standards and external lane ladders were also used for adjustment. Sequenced allelic ladders were used for each system as recommended by the DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics.

Statistical Approach

The frequency of each allele for each locus was calculated using the gene count method. Observed heterozygosity (H) was calculated and possible divergence from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was determined by using the exact test proposed by Guo and Thompson (1992). The genotype linkage disequilibrium was calculated using the updated version of GENEPOP. The power of discrimination (PD) and the 'a priori' chance exclusion value (CE) were calculated.

A Principal Component Analysis (PCA) was obtained from the allelic frequencies of the reported populations and the sum of markers used in this study in order to evaluate the relationships between the Amerindian groups living in the Beni. Comparisons with other populations with available data from the rest of the world were performed using the frequencies of the HUMTH01 and HUMCSF1PO alleles and represented in an UPGMA dendrogram based on Reynolds genetic distance (Reynolds et al. 1983) using the PHYLIP package (Felsenstein 1993).

Haplogroup isofrequency maps were generated using the Kriging interpolation method, an averaging statistic method applied to haplotype frequency data in relation to geographical distribution. We used Surfer 8 program of Golden Software. Data were compared with major linguistic maps (Greenberg, 1987)

We interpolated haplogroup frequencies among 49 Amerindian groups from across South America, from our previous work (Bert et al 2001) and previously cited literature.

Results and Discussion

Table 1 shows observed allele frequencies for the four STR loci and for each population in the studied area. Alleles were designated according to the number of repeats. If we take into account the whole studied populations, the HUMTH01 locus exhibited a total of six alleles, two of them (6 and 7 repeats) showing high frequencies in the sample. The HUMVWA31A locus showed a total of eight alleles but only three (15, 16 and 17 repeats) were found with a relatively high frequency in all populations studied. The HUMCSF1PO locus showed six alleles. The alleles 10, 11 and 12 were the most frequent in the studied populations. HUMTPOX locus exhibited five alleles and the most frequent repeats were alleles 8 and 11.

Statistical parameters of genetic variability such as heterozygosity and Hardy-Weinberg equilibrium test are depicted in table 2. All the systems show heterozygosity values ranging between 0.286 and 0.909, with a mean value of 0.558. The values of HWE were calculated based on the expected and observed number of heterozygotes. All loci were found to be in the Hardy-Weinberg equilibrium except for HUMVWA31A and HUMTPOX in Mosestenean populations and HUMTH01 in Beni population.

A Principal Component Analyses (PCA) was performed with the allelic frequencies of the Beni populations of the four STR systems (Figure 2). The first principal component was responsible for the 42.3% of variance and discriminated clearly the aymara and quechua Andean groups from the rest of populations. The second principal component was responsible for 28.5% of variance and differentiates the Mosestenean speaking populations chimane and mosesten living in the Piedmont from populations living in the Llanos de Moxos: ignaciano, trinitario, movima and yuracare.

An UPGMA tree was generated using allele frequencies of HUMTH01 and HUMCSF1PO in a worldwide sample to find the relationship between these different populations and the groups reported in the present study (Figure 3). The criteria that best explains the shape of the tree is the geographic origin of the populations. There are two main clusters: one formed exclusively by Amerindian populations and another composed by groups of the rest of continents. The only exception to this fact is the dogrib group, that although they are native Americans from Canada, they belong to the linguistic na-dene stock differentiated from the Amerindian linguistic stock.

All the Beni groups are placed in the cluster composed exclusively of Amerindian populations. In this cluster, populations are united by language or cultural affinity. The Central Amerindian cabecar population is separated from the rest of South Amerindian populations. We can also observe in this cluster a clear dichotomy separating related Andean populations from Bolivia and north Argentinean from populations living in the Bolivian Llanos.

The isofrequency map of haplogroup A (Figure 4.) indicates a possible expansion of Chibchan populations from Central America that would influenced Colombia, Venezuela and Ecuador, the presence of this haplogroup in the rest of the South-American continent is sparse with a no more clear increase of the frequency, in fact, the values get losing numbers from north to south.

There seems to be no doubt that this group of people came from the extreme northwest since they are not only strongly concentrated there but regions occupied by them are found in the Isthmus itself, in Mexico, and even in Florida. One direction of their movement was southward along the west coast, quite possibly displacing or overrunning Andean peoples and, in the southern part isolating one Andean region from the rest. They also penetrated along the northern coast, occupying a region which, as far as we can tell, was not inhabited. But, from this northern coastal region they apparently moved due south in a fairly narrow band until they reached the Pacific Coast in the region of modern Chile.

The map of haplogroup B (Figure 4) indicates an expansion of people with high frequency of this haplogroup, both in the Central Andean zone, getting the northern area, the limits of the southern region are quite uncertain. This expansion would be linked to the development of the Andean cultures and consequently due to their influenced area, but it is the result of the Pano-speaking growth too.

Assuming that immigration came from the north, this group appears to have originated in the extreme north of Peru and the adjacent region of Brazil. It is probably very significant that this region is inland from the only location between Colombia and central Chile where the massive barrier of the Andes is broken by a lower saddle of mountains. The genetic map has a high correlation with the linguistic map in the south region.

A second expansion took place in Amazonian Ge-speaking area. The Ge-speaking groups may derive from a original Equatorial stock of populations living in the area. Isofrequency map of haplogroup C (Figure 4) points out a possible expansion of the Arawakan populations from Casiquiare river near the Colombia and Venezuela border. The Arawakan Equatorial group is by far the most widespread of all the South-Amerindian languages. In their expansion, they disrupted and displaced other populations and left a large number of isolated "islands" of other groups in its wake.

The Carib-speaking people would be the other group that expanded from the Guyana Uplands, disrupting the previous Chibchan area in the north as well as the thrust to the south. The present major areas occupied by this group are in the north and it seems reasonable that this might have been where they originated. They then would have moved west and south as we indicate in the map. The isofrequency map of haplogroup D (Figure 4) indicates an expansion of Arawakan populations and Tupi populations from the actual Rondonia department of Brazil.

In the central Andean area there is evidence of highly complex patterns of long-term cultural convergence, interference and mutual influence between aymara, quechua and other Andean populations. We can unite the Andean people into different 'spheres', zones which at different episodes in time have functioned as single units. The population process of the Andes has been characterized by an alternation between periods of greater fusion and integration of different peoples and languages with extensive genetic flow and admixture amongst those populations, and periods of fragmentation and isolated development where genetic drift would be the principal genetic pattern. In conclusion, all the isofrequency maps seem to be corroborated by the linguistic origin and migration of the main linguistic groups of South America (Figure 5).

Phylogenetic trees derived from the genetic distances tend to cluster Amerindian populations by geographic proximity and linguistic affinity. We observe that the populations from Piedmont join in the same cluster indicating the existence of a

certain degree of genetic flow amongst these populations and the same affirmation is certain for populations living in the Llanos de Moxos. The fact that the quechua and aymara living in the Beni Piedmont show a close relationship is due to the Andean peculiarities of these populations. In the North and Central Andean region complex social structures were developed over centuries, achieving high demographic levels, so that an important gene flow might have occurred resulting in this vast territory to act as a homogeneous genetic space, in comparison to other South American habitats (Stanish 2001).

The Piedmont and Llanos de Moxos, were peopled by different cultures in different episodes. One known example of entrance in the Llanos de Moxos is the case of the Arawak speaking people who developed complex and structured societies called *Cacicazgos* in this area. The proclivity to trade, create alliances, and explore new areas in the Amazonian basin were a characteristic cultural feature of Arawak speaking groups. Such cultural dynamics have been of significance for their cultural capacity to integrate remote areas of the South American lowlands into a common continent wide trade network and for the genetic and cultural homogenisation of the different populations that previously lived in those areas.

In the second millennium BC, Arawak-speakers expanded from their point of origin, somewhere near the Casiquiare canal (which connects the Orinoco and the Río Negro) northwards along the Orinoco to the Caribbean and southwards along the Río Negro to the central Amazon. From the central Amazon area, Arawakan languages continued to spread southward along the Purús and Madeira Rivers to the lowlands of Peru and Bolivia, where Arawak speaking groups established themselves as middlemen in the trade between the lowlands and the Andean highlands (Heckenberger 2002).

The dispersed pockets of Arawakan dialects that have been documented nowadays along the river systems from the lower Orinoco to the upper Madeira appear to be the remains of a contiguous network of Arawak societies that in prehistoric times spanned the entire extent of western Amazonia. These events would have had a cultural rather than genetic homogenisation effect and it is a clear difference in the procedure of social linkage amongst people compared with the Andean socio-cultural record.

The difference between the river-based Arawak and the more marginalized Pano upland groups like chimane and moseten can be attributed by elements of their kinship systems. Kinship terminologies and marriage rules between Pano express locally endogamous, atomized, and introverted exchange relations, while the Arawakan tends to extend the category of classification code encouraging distant alliances beyond an expansive field of consanguineous kin (Hornborg 1998). The expansively Arawakan identity would have derived in part from the inclination, among offspring of inter-ethnic marriages, to choose to identify with their more prestigious Arawakan parent.

Several indications suggest that the main linguistic families of Amazonia are related and they are a more product of regional ethno-genetic processes rather than a result of migrations from other parts of the continent. In this sense, the existence of a definite genetic cluster that joins ignaciano, trinitario, yuracare and movima populations would corroborate this hypothesis. The significance of ecological factors in these processes deserves also to be considered. Meggers (1987) has suggested that drought related fluctuations in the extent of forest vegetation have contributed to the geographical distribution of different language families, some of whom (e.g., horticulturalists like Arawak and Pano) were originally confined to distinct forest refuge but subsequently expanded, at the expense of savannah dwelling hunter-gatherers, with

the recovery of the rainforest as the climate grew more humid. However, ecological factors can be assumed to be significant for the distribution of Arawak that practice wetland agricultural techniques. Heckenberger (2002) says that the recent expansion of Arawak speakers along floodplains and wet savannas from the Llanos of Venezuela to the Llanos of Bolivia over the course of a millennium and a half suggests the systematic exploitation of an existing ecological niche.

Acknowledgements: This study was funded by the Spanish DGICYT Project PB97-925. We are grateful to all populations who collaborated in the present study, to Dr. Castro of San Ignacio Hospital, Dra. Greet Diltiens and Dra. Roser Montagut for their cooperation in the recollection of samples. We are also grateful to Dr. J. Cerdà of the Laboratorio de Biología 'San Calixto' from La Paz, Bolivia, for his help.

Bibliography

- Alves C, Gusmao L, Amorim A. 2001. STR data (AmpFISTR Profiler Plus and GenePrint CTTv) from Mozambique. *Forensic Sci. Int.* 119: 131-133.
- Barrantes R, Ferrell RE, Chakraborty R. 1999. Genetic variation at twenty-three microsatellite loci in sixteen human populations. *J. Genet.* 78: 99-121.
- Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A and Turbón D. 2001. Major Mitochondrial DNA Haplotype Heterogeneity in Highland and Lowland Amerindian Populations from Bolivia. *Hum Biol*, 73:1-16.
- Bosch E, Clarimón J, Pérez-Lezaun A, Calafell F. 2001. STR data for 21 loci in northwestern Africa. *Forensic Sci. Int.* 116: 41-51.
- Budowle B, Nhari LT, Moretti TR, Kanoyangwa SB, Masuka E, Defenbaugh DA, Smerick JB. 1997. Zimbabwe black population data on the six short tandem repeat loci - CSF1PO, TPOX, TH01, D3S1358, VWA, and FGA. *Forens. Sci. Int.* 90: 215-221.
- Cerrón-Palomino R. 1987. *Unidad y diferenciación lingüística en el mundo andino*. Lexis, 11: 1, pp. 71-010-t. and in López, Luis Enrique (Comp.): *Pesquisas en lingüística andina*. Lima: Gráfica Bellido, pp. 121-152.
- Deka R, Shriver MD, Yu LM, Mueller Heidreich E, Jin L, Zhong Y, McGarvey ST, Swarup Agarwal S, Bunker CH, Miki T, Hundrieser J, Yin S-J, Raskin S, Barrantes R, Ferrell RE, Chakraborty R. 1999. Genetic variation at twenty-three microsatellite loci in sixteen human populations. *J. Genet.* 78: 99-121.
- De Pancorbo MM, Castro A, Fernández-Fernández I, García-Orad A. 1998. Population genetics and forensic applications using multiplex PCR (CSF1PO, TPOX, and TH01) loci in the Basque Country. *J. Forensic Sci.* 43: 1181-1187.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. 1992. Genetic variation at five Trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12:241-253.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.572c. Distribution by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle W.A.
- Gené M, Carracedo A, Huguet E, Pérez-Pérez A, Moreno P. 1998. Population genetics of the D12S391, CSF1PO and TPOX loci in Catalonia (Northeast Spain) *Int J Legal*

Med 111: 52-54.

Greenberg JH. 1987. *Language in the Americas*. Stanford: Stanford University Press.

Guo S, Thompson E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.

Heckenberger M. 2002. *Rethinking the Arawakan diaspora: Hierarchy, regionality, and the Amazonian formative*, in *Comparative Arawakan histories: Rethinking language family and culture area in Amazonia*. Edited by J.D. Hill & F. Santos-Granero, pp.99-122. Urbana: University of Illinois Press.

Hornborg A. 1998. *Serial redundancy in Amazonian social structure, in Transformations of kinship*. Edited by M. Godelier, T.R. Trautmann and F. Tjon Sie Fat, pp.168-186. Washington: Smithsonian Institution Press.

Hou Y, Li Y, Wu J, Tang J, Prinz M. 2000. Polymorphisms of 13 STR markers in Chinese population. *Progr. Forensic Genet.* 8: 242-244.

Huang EN, Schumm J, Budowle B. 1995. Chinese population data on three tetrameric short tandem repeat loci – HUMTH01, CSF1PO and TPOX – derived using multiplex PCR and manual typing. *Forensic Sci Int* 71: 131-136.

Huguet E, Borrego N, Pinheiro, MF, Luna M, Corbella J, Mas J, Gené M, Moreno P. 1998. Annobon Island population (Equatorial Guinea) characterised by five VNTRs-PCR polymorphisms. *Progr. Forensic Genet.* 7: 329-331.

Kimpton C, Walton AP, Gill PA. 1992. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the VWA gene., *Hum. Mol. Genetics* 1:287.

Klitschar M, Kozma Z, Al Hammadi N, Abdull Fatah M, Nöhammer C. 1998. A study on the short tandem repeat systems HumCD4, HumTH01 and HumFIBRA in population samples from Yemen and Egypt. *Int. J. Legal Med.* 111: 107-109.

Lathrap DW. 1970 *The Upper Amazon*. London: Thames and Hudson.

Martínez-Jarreta B, Diaz Roche P, Budowle B, Abecia E, Castellano M, Casalod Y. 1998. Pyrenean population data on 3 tetrameric short tandem repeat loci - HUMTH01, TPOX and CSF1PO-derived using a STR multiplex system. *Progr. Forensic Genet.* 7: 312-314.

Meggers B. 1987. *The early history of man in Amazonia, in Biogeography and quaternary history in tropical America*. Edited by T.C. Whitmore & G.T. Prance, pp.151-174. Oxford: Clarendon Press.

Möller A, Wiegand P, Gruschow C, Seuchter SA, Baur MP, Brinkmann B. 1994. Population data and forensic efficiency values for the STR systems HUMVWA, HUMMBP and HUMFABP. *Int J Legal Med* 106: 183-189.

Pérez-Lezaun A, Calafell F, Clarimón J, Bosch E, Mateu E, Gusmão L, Amorim A, Benchemsi N, Bertranpetit J. 2000. Allele frequencies of 13 short tandem repeats in population samples from the Iberian Peninsula and Northern Africa. *Int. J. Legal Med.* 113: 208-214.

Rahman Z, Afroze T, Weir BS. 2001. DNA typing results from two urban subpopulations of Pakistan. *J. Forensic Sci.* 46: 111-115.

Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short term genetic distance. *Genetics* 105:767-779.

- Rostedt I, Lalu K, Lukka M, Sajantila A. 1996. Genotyping of five short tandem repeat loci via triplex and duplex PCR. *Forens. Sci. Int.* 82: 217-226.
- Sala A, Penacino G, Corach D. 1998. Comparison of allele frequencies of eight STR loci from Argentinian Amerindian and European populations. *Hum. Biol.* 70: 937-947.
- Stanish C. 2001. The origin of state societies in South America. *Annu. Rev. Anthropol* 30:41-64.
- Touret N, López Gamelo J, Vidal-Rioja L. 1999. Allele frequencies of six STR loci in Argentine populations. *J. Forensic Sci.* 44: 1265-1269.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513.
- Wiegand P, Budowle B, Rand S, Brinkmann B. 1993. Forensic validation of the STR systems SE33 and TC11. *Int J Legal Med* 105: 315-320.
- Xiaodong X, Xunling W, Xiaolin H, Guifang R, Xiaolin L. 2001. Tibetan population data on the PCR-typed loci D16S539, D7S820, D13S317, HUMF13A01, FESFPS, vWA, HUMTH01, TPOX and CSF1PO. *Int. J. Legal Med.* 114: 349-351.
- DNA recommendations. 1992. Report concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms. *Int J Legal Med* 105: 63-64.
- DNA recommendations. 1994. Report concerning further recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics regarding PCR-based-polymorphisms in STR systems. *Int J Legal Med* 107: 159-160.

Figure Captions

- Figure 1.** Map showing the geographic location of the populations studied into the Beni Department (Bolivian).
- Figure 2.** Principal Component Analysis obtained from the allelic frequencies of the reported populations.
- Figure 3.** UPGMA tree generated from TH01 and CSF1PO frequencies of the populations studied by the authors adding other representative worldwide human groups
- Figure 4.** Isofrequency maps from mtDNA haplogroups A, B, C and D frequencies of the studied populations adding other South Amerindian populations.

Figure 1. Map showing the geographic location of the populations studied into the Beni Department (Bolivian).

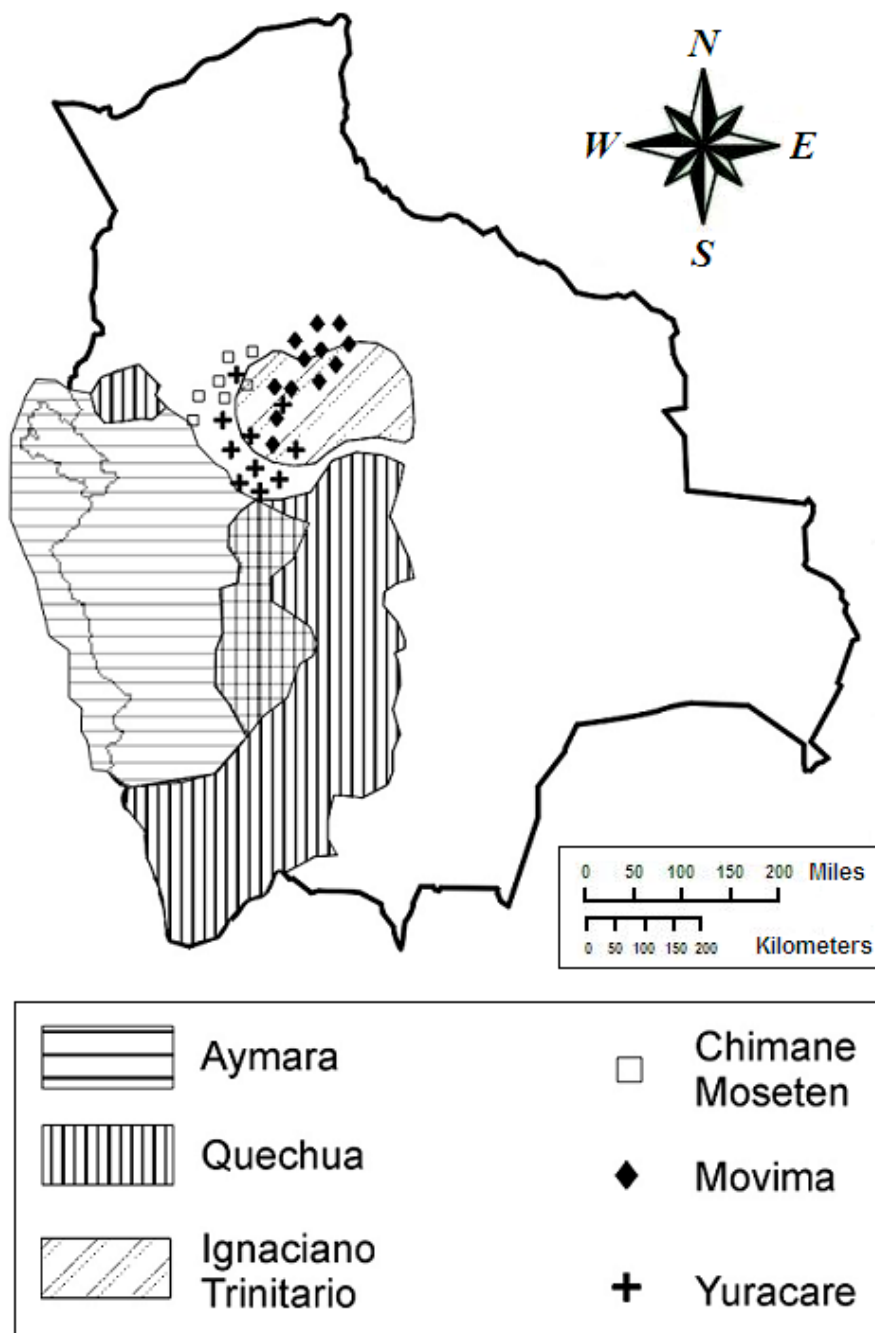


Figure 2. Principal Component Analysis obtained from the allelic frequencies of the reported populations.

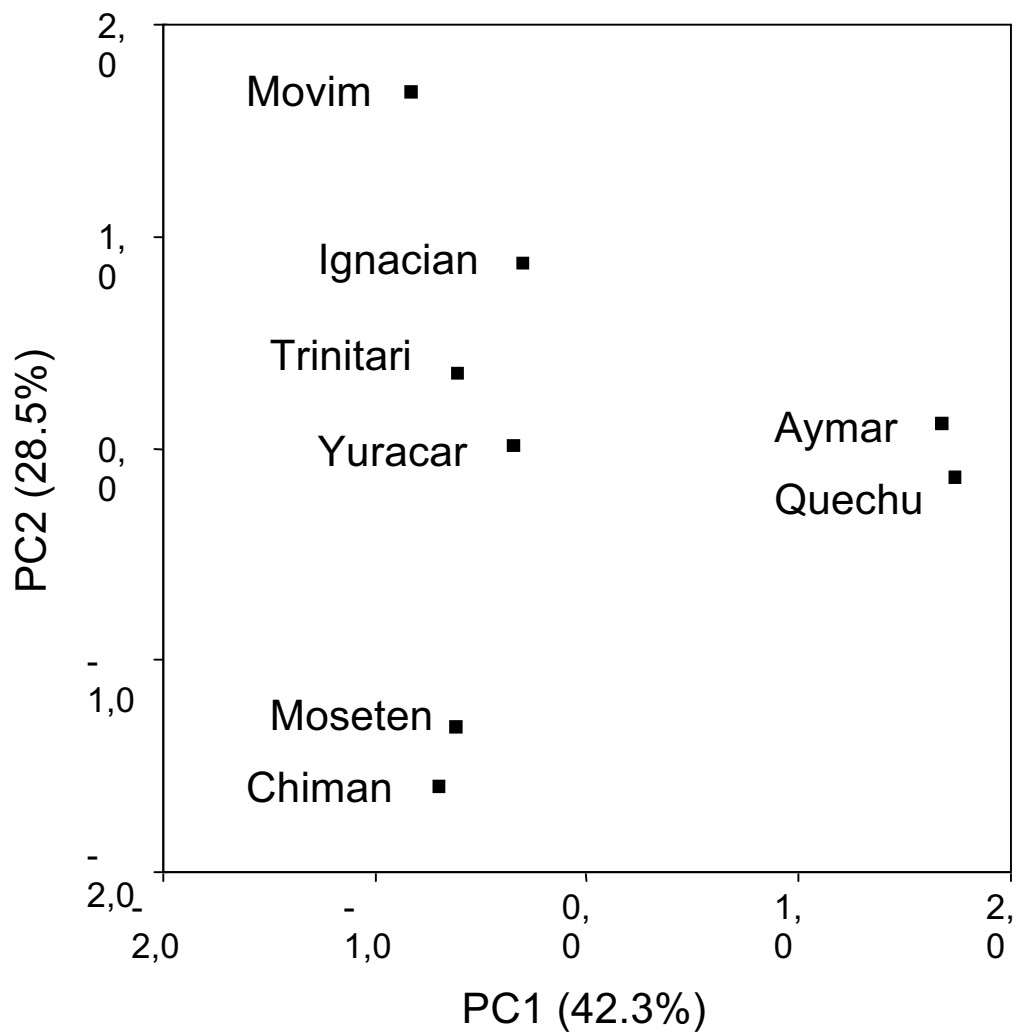


Figure 3. UPGMA tree generated from TH01 and CSF1PO frequencies of the populations studied by the authors adding other representative worldwide human groups

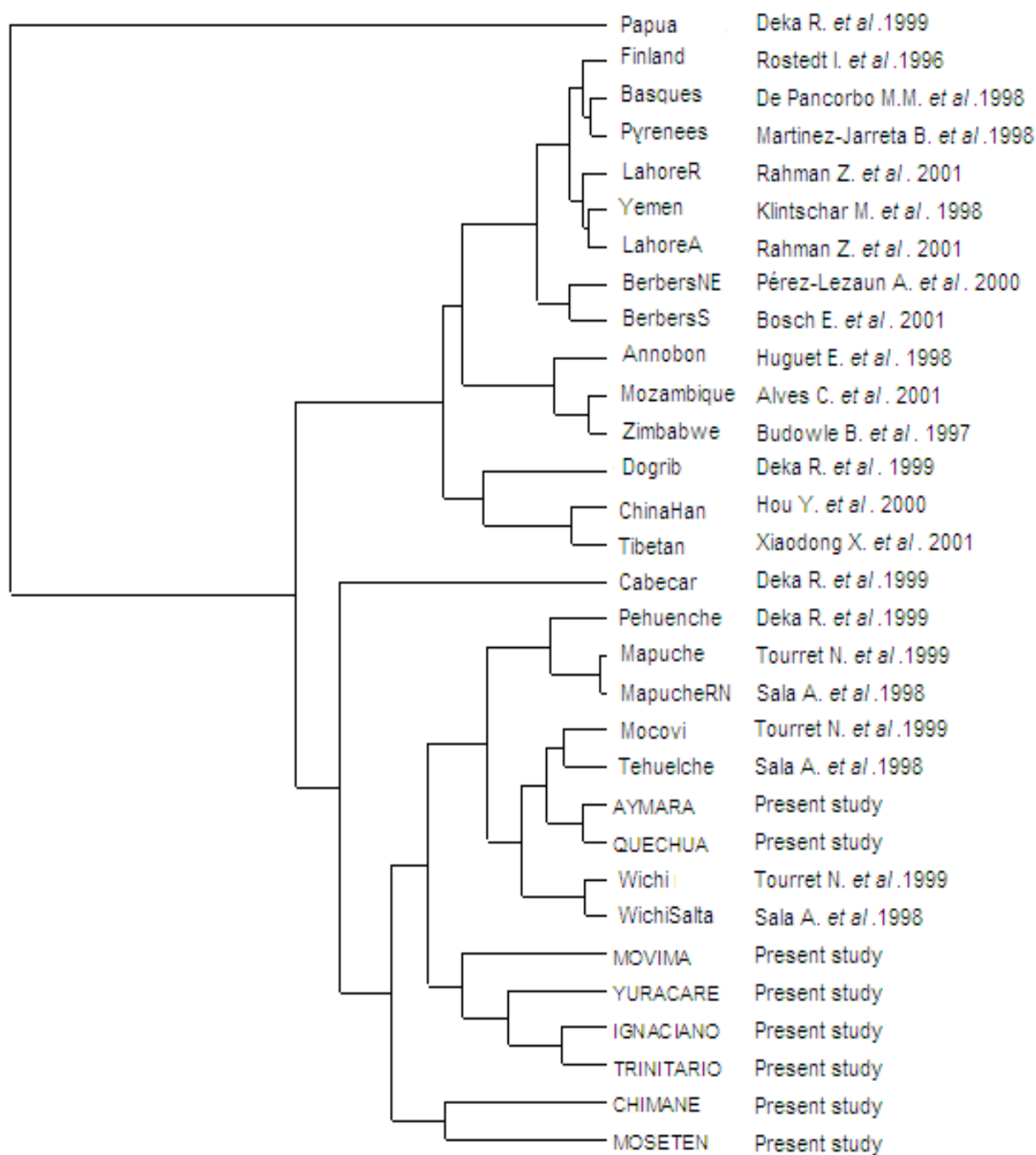


Figure 4. Isofrequency maps from mtDNA haplogroups A, B, C and D frequencies of the studied populations adding other South Amerindian populations.

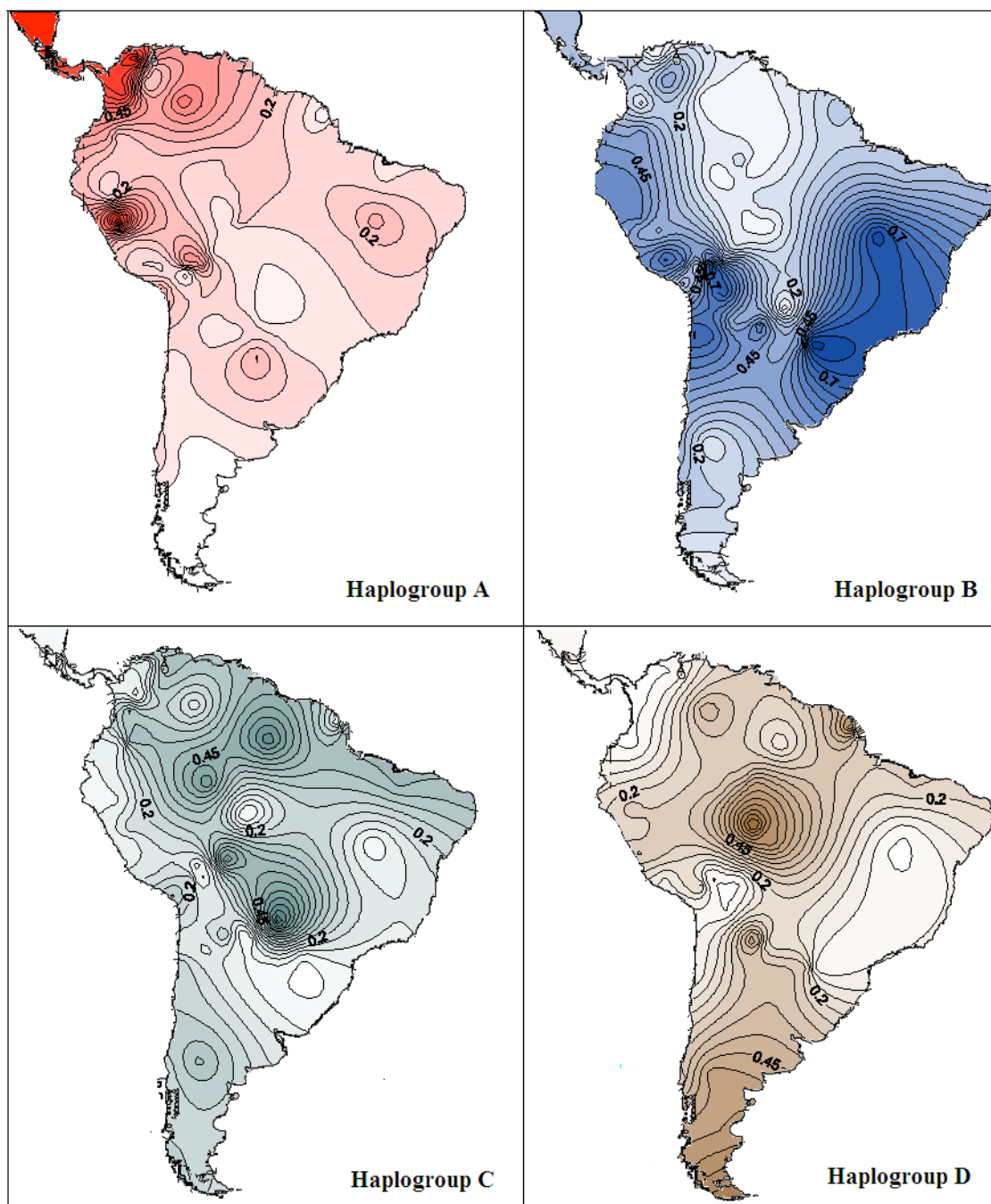


Figure 5. Map of the original distribution and migration of the main Amerindian linguistic groups. WG Davey using J H Greenberg original maps (1987).

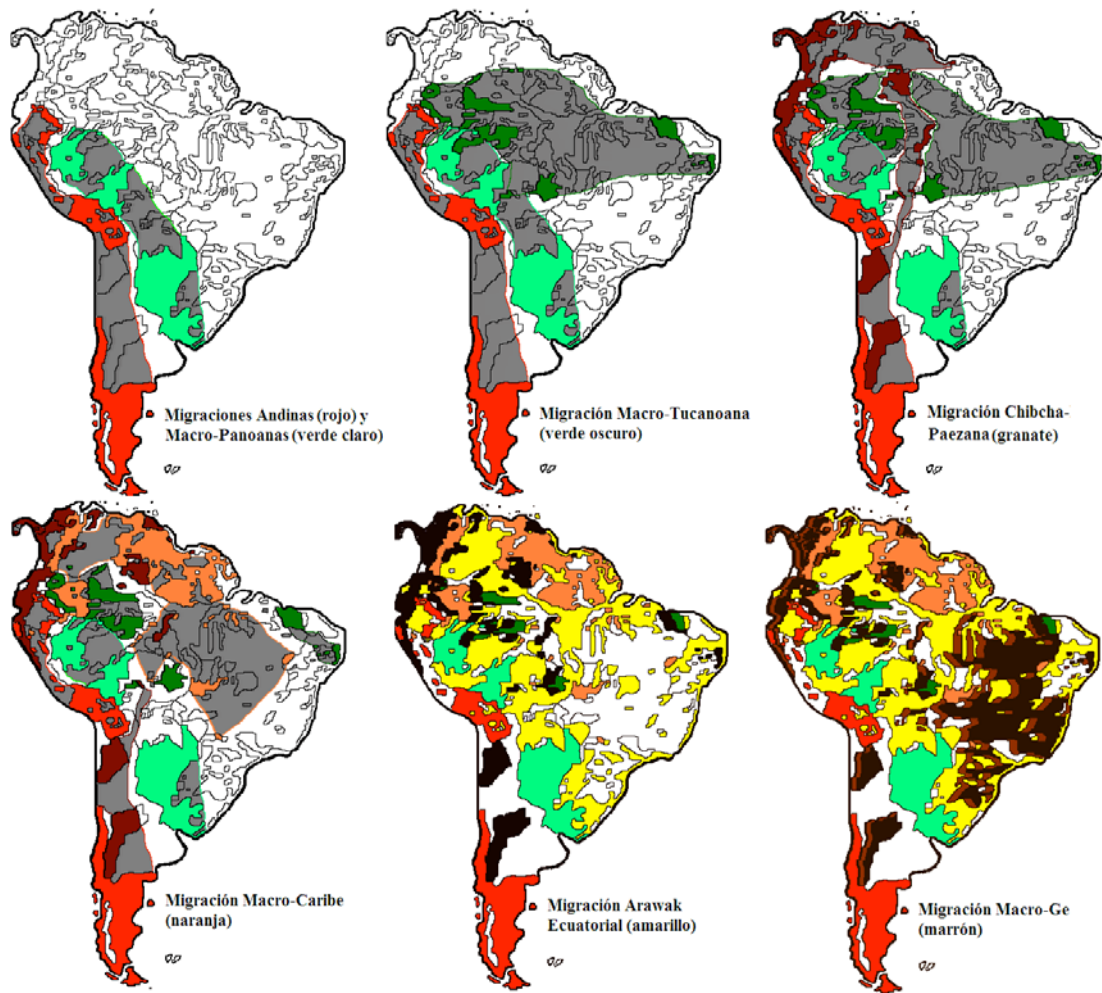


Table 1. Allele frequencies for the populations reported in the present study for each STR

Population	TH01 alleles					
	6	7	8	9	9.3	11
Chimane	0.370	0.611	0.000	0.000	0.000	0.019
Moseten	0.350	0.600	0.000	0.000	0.050	0.000
Mosetenean1	0.365	0.608	0.000	0.000	0.014	0.014
Ignaciano	0.344	0.563	0.000	0.031	0.063	0.000
Trinitario	0.545	0.432	0.000	0.000	0.023	0.000
Mojeños2	0.461	0.487	0.000	0.013	0.039	0.000
Yuracare	0.286	0.714	0.000	0.000	0.000	0.000
Movima	0.375	0.542	0.000	0.083	0.000	0.000
BENI populations3	0.389	0.566	0.000	0.022	0.018	0.004
QUECHUA	0.185	0.593	0.009	0.014	0.199	0.000
AYMARA	0.209	0.616	0.000	0.012	0.163	0.000

Population	VWA alleles							
	13	14	15	16	17	18	19	20
Chimane	0.000	0.000	0.679	0.054	0.107	0.161	0.000	0.000
Moseten	0.000	0.000	0.611	0.278	0.000	0.111	0.000	0.000
Mosetenean1	0.000	0.000	0.662	0.108	0.081	0.149	0.000	0.000
Ignaciano	0.000	0.125	0.438	0.281	0.156	0.000	0.000	0.000
Trinitario	0.000	0.023	0.591	0.273	0.068	0.045	0.000	0.000
Mojeños2	0.000	0.066	0.526	0.276	0.105	0.026	0.000	0.000
Yuracare	0.000	0.000	0.579	0.263	0.158	0.000	0.000	0.000
Movima	0.036	0.036	0.464	0.357	0.107	0.000	0.000	0.000
BENI populations3	0.008	0.029	0.561	0.242	0.107	0.053	0.000	0.000
QUECHUA	0.005	0.014	0.157	0.315	0.338	0.120	0.042	0.009
AYMARA	0.000	0.017	0.054	0.392	0.438	0.058	0.038	0.004

Population	CSF1PO alleles					
	9	10	11	12	13	14
Chimane	0.000	0.308	0.500	0.135	0.058	0.000
Moseten	0.167	0.167	0.500	0.167	0.000	0.000
Mosetenean1	0.017	0.293	0.500	0.138	0.052	0.000
Ignaciano	0.033	0.167	0.133	0.533	0.133	0.000
Trinitario	0.033	0.100	0.200	0.533	0.133	0.000
Mojeños2	0.033	0.133	0.167	0.533	0.133	0.000
Yuracare	0.000	0.045	0.273	0.455	0.227	0.000
Movima	0.000	0.318	0.182	0.273	0.182	0.045
BENI populations3	0.016	0.217	0.288	0.337	0.130	0.011
QUECHUA	0.009	0.164	0.327	0.455	0.045	0.000
AYMARA	0.010	0.240	0.323	0.365	0.042	0.021

Table 1. (Cont.)

Population	TPOX alleles				
	8	9	10	11	12
Chimane	0.385	0.019	0.000	0.577	0.019
Moseten	0.250	0.000	0.000	0.750	0.000
Mosetenean1	0.367	0.017	0.000	0.600	0.017
Ignaciano	0.367	0.000	0.000	0.300	0.333
Trinitario	0.433	0.000	0.000	0.400	0.167
Mojeños2	0.400	0.000	0.000	0.350	0.250
Yuracare	0.500	0.000	0.000	0.417	0.083
Movima	0.091	0.000	0.000	0.500	0.409
BENI populations3	0.330	0.005	0.000	0.473	0.191
QUECHUA	0.500	0.009	0.009	0.336	0.147
AYMARA	0.622	0.020	0.000	0.194	0.163

1. Mosetenean = Sum of Chimane and Moseten populations

2. Mojeños = Sum of Ignaciano and Trinitario populations

3. BENI populations = Sum of Chimane, Moseten, Ignaciano, Trinitario, Yuracare and Movima

Table 2. Values of heterozygosity (H), power of discrimination (PD), chance of exclusion (CE) and *p* value for Hardy-Weinberg equilibrium test (HWE) for populations reported in the present study and for each STR.

STR	Population	H	PD	CE	HWE
THO1	Mosetenan	0.4595	0.6647	0.2132	0.8931
	Mojeños	0.4737	0.7216	0.2513	0.5163
	Yuracare	0.2857	0.5714	0.1624	0.2580
	Movima	0.5833	0.5833	0.2718	0.0428
	BENI	0.4690	0.6813	0.2383	0.0037
	QUECHUA	0.5556	0.7623	0.3248	0.2264
	AYMARA	0.5349	0.7388	0.3015	0.5597
VWA	Mosetenan	0.3784	0.6662	0.3073	0.0016
	Mojeños	0.5789	0.8075	0.3824	0.7898
	Yuracare	0.5263	0.7368	0.3036	0.5543
	Movima	0.7857	0.7347	0.3786	0.4888
	BENI	0.5574	0.7897	0.3731	0.1325
	QUECHUA	0.6759	0.8933	0.5188	0.0879
	AYMARA	0.6583	0.8137	0.3869	0.4604
CSF1PO	Mosetenan	0.6897	0.7872	0.3853	0.4332
	Mojeños	0.5667	0.8267	0.4230	0.3635
	Yuracare	0.6364	0.8264	0.3963	0.7507
	Movima	0.9091	0.7934	0.5258	0.2289
	BENI	0.6957	0.8816	0.4984	0.0756
	QUECHUA	0.8000	0.7835	0.3904	0.2808
	AYMARA	0.6667	0.8385	0.4429	0.1635
TPOX	Mosetenan	0.3333	0.6689	0.2214	0.0375
	Mojeños	0.4667	0.8222	0.3609	0.1252
	Yuracare	0.7500	0.6111	0.2756	0.7614
	Movima	0.7273	0.6446	0.2817	0.7714
	BENI	0.5213	0.8042	0.3449	0.0866
	QUECHUA	0.5517	0.7830	0.3373	0.1699
	AYMARA	0.5510	0.7389	0.3057	0.7641

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1 Aspectos biodemográficos de los grupos Macro-Pano del Piedemonte

La región del Piedemonte presenta un gran interés para las investigaciones antropológicas, tanto desde el punto de vista macro como micro evolutivo, las razones que apuntan a éste interés son la ubicación demográfica, el variable efectivo poblacional de sus etnias y la etnohistoria del territorio. Sin embargo, hasta 1994 no se habían realizado ningún censo indígena exhaustivo que contemplara la realidad demográfica de dichas poblaciones (I Censo Indígena Bolivia 1994).

Si bien existe un diagnóstico sociodemográfico de los pueblos indígenas a partir del Censo Nacional de 2001, elaborado por la Comisión Económica para América Latina (CEPAL) de las Naciones Unidas y el Banco Interamericano de Desarrollo (BID) donde se analizan de forma general muchos parámetros sociodemográficos de los grupos indígenas de todo el país, todavía no existe una explotación de los datos que el Censo Indígena de 1994 puede revelar. Tampoco existen datos concluyentes que informen del grado de precariedad de las poblaciones del Oriente boliviano que describan, en cada caso, el grado de riesgo de desaparición étnica de cada una de ellas, aunque estudios parciales y aislados hablan de que algunas poblaciones están en situación límite.

La vulnerabilidad de las poblaciones indígenas del Beni puede estimarse utilizando deferentes criterios (Díez Astete, 2004).

1. La dimensión demográfica (pueblos minoritarios y en el límite de su posibilidad de reproducción biológica).
2. La disponibilidad de espacio vital y ocupación agresiva de su territorio y recursos.
3. La exclusión de los servicios básicos (falta de servicios públicos como educación, salud, agua potable, electricidad y otros).
4. La presencia de indicadores negativos de salud en la población expresada en altas tasas de mortalidad previsible. Esto es particularmente importante entre los grupos más aislados y los pueblos en contacto inicial que no disponen de anticuerpos para las enfermedades de la sociedad mayor. Estos pueblos son especialmente vulnerables a enfermedades de extrema gravedad frecuentemente resultado de su marginación social (VIH-SIDA, tuberculosis, paludismo, micosis pulmonares).

5. La agresión física y cultural (agresiones por empresas madereras, castañeras, mineras, sectas, colonizadores, pescadores y cazadores, etc).
6. La disponibilidad de alimentos, frecuentemente asociada a la posesión de espacios vitales de una dimensión suficiente para sustentar modos de producción itinerantes.
7. Pérdida de identidad cultural y destrucción del tejido social, entre otros, la pérdida parcial o total del idioma, de la cohesión social, de las estructuras de poder y de la visión cosmologica de su mundo.
8. La contaminación ambiental que pone en riesgo su supervivencia al afectar el equilibrio de sus recursos naturales como la contaminación de los ríos debido a la minería y las ciudades en sus cursos altos, la explotación petrolera y los agroquímicos.
9. Relaciones de cautividad y servidumbre, pueblos o segmentos de la población que sufren relaciones de servidumbre o cautiverio.

En el Oriente de Bolivia, la mayoría de las poblaciones autóctonas dispone de territorios propios con densidades demográficas bajas que persistentemente son ocupados por colonos. La dimensión cuantitativa de las comunidades indígenas minoritarias no está bien delimitada ya que el censo seguramente tiene mayores niveles de subregistro en los territorios donde habitan estos pueblos.

La presente tesis ha analizado algunos aspectos demográficos de las poblaciones indígenas de la zona del Piedemonte.

En la figura 44 se presenta la ubicación de cada uno de los pueblos indígenas de habla Andina y Macro-Pano estudiadas que actualmente viven en la región andina y del Piedemonte andino.

La figura 45 muestra el tanto por ciento de individuos según sexo que han nacido dentro o fuera de la comunidad donde residen y de los que han nacido fuera de la comunidad, se muestra el tanto por ciento de individuos que han nacido en la misma provincia o fuera de la provincia donde residen. Se observa que la etnia Chimane presenta una menor movilidad tanto en lo que se refiere a los hombres como a las mujeres, mientras que la etnia Mosestén presenta una mayor movilidad masculina. La menor movilidad entre provincias se encuentra en la etnia Maropa.

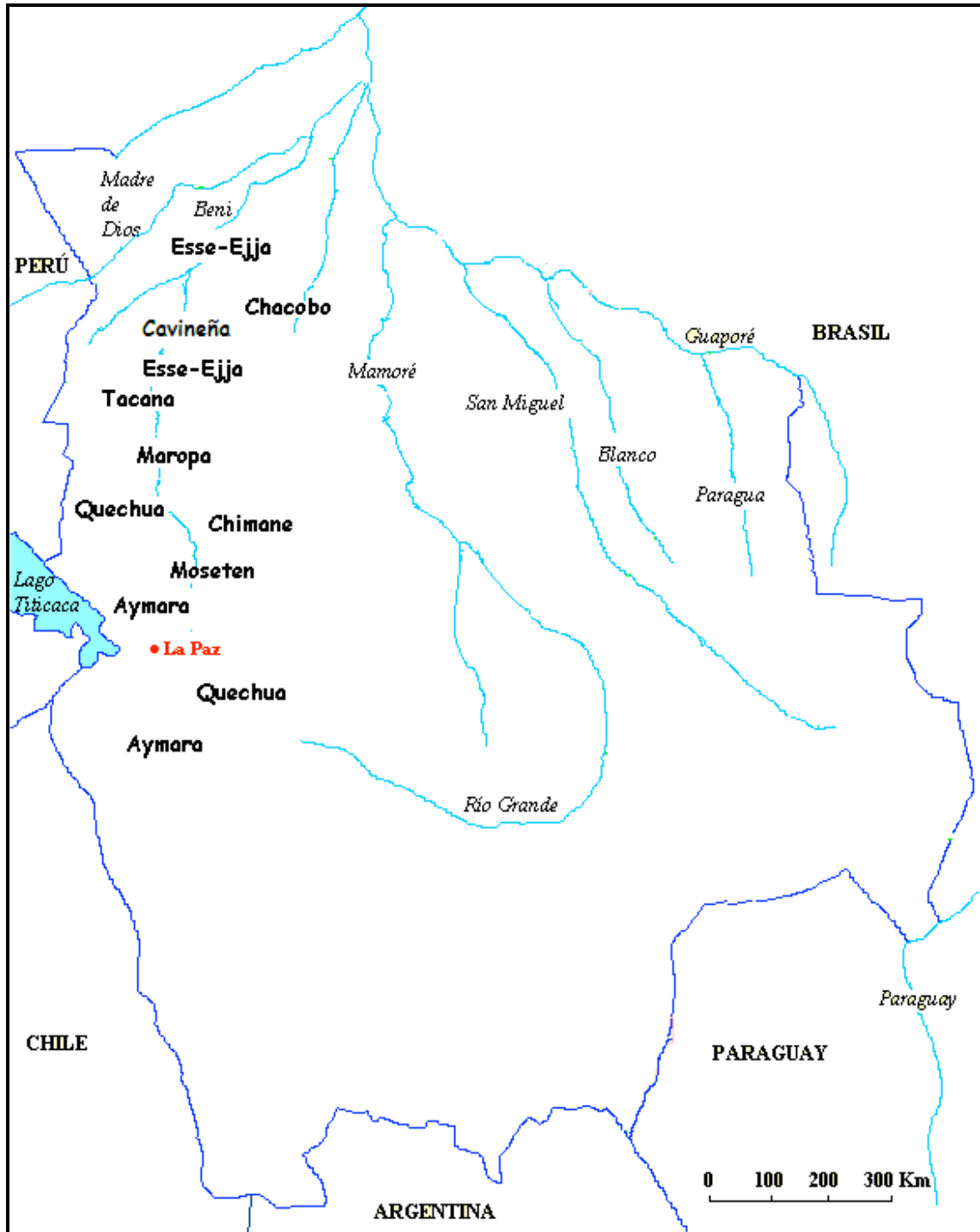


Fig. 44 Localización de las étnias del grupo lingüístico Andino y Pano-Tacana estudiadas en este apartado.

ASPECTOS BIODEMOGRÁFICOS DE GRUPOS ÉTNICOS MACRO-PANO DE BOLIVIA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES AYMARÁ, QUECHUA, CHIMANE Y MOSETÉN

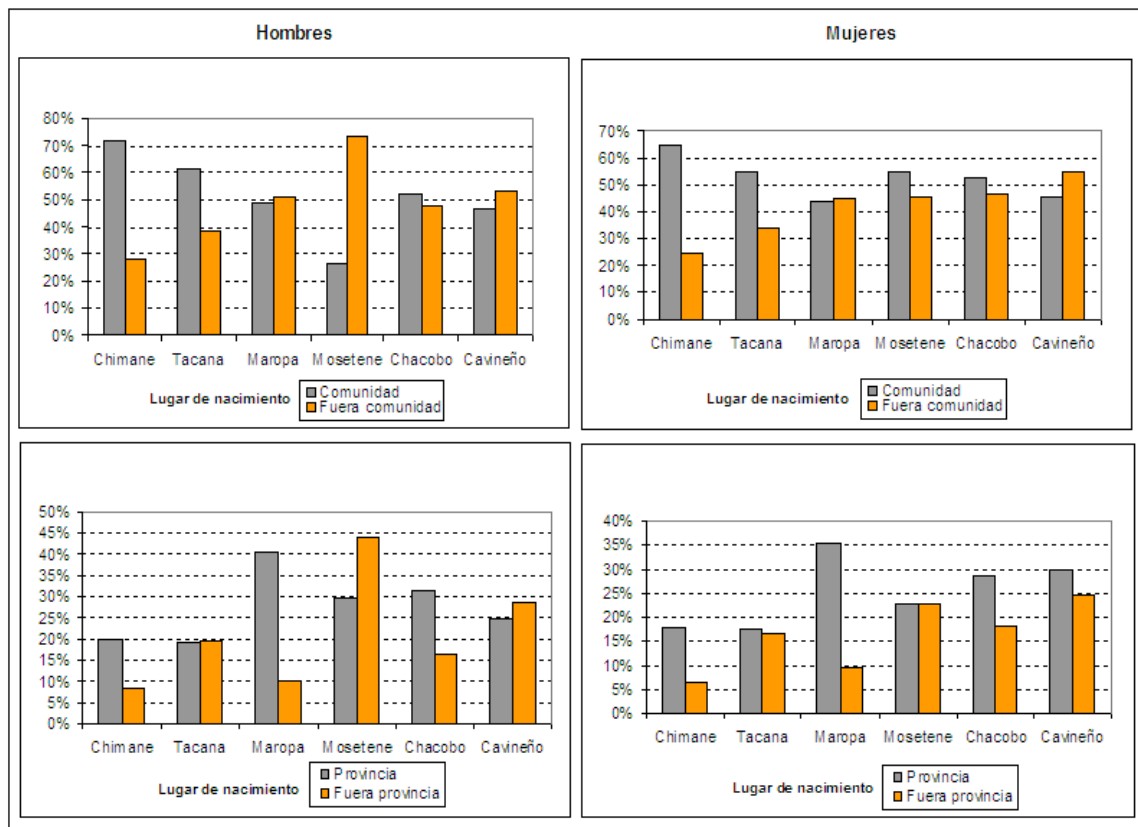


Fig. 45 Lugar de nacimiento por sexo de las diferentes étnias estudiadas.

4.1.1 La etnia Chimane

Los primeros contactos de la etnia Chimane con los europeos se dieron por medio de los misioneros jesuitas que fundaron la misión de San Borja (1693) en el Departamento del Beni. Posteriormente, los franciscanos continuaron esta tarea, teniendo mayor suerte con los miembros de la etnia Mosetén que con los Chimanes. Al igual que con otros grupos indígenas de ambientes selváticos, el contacto con los europeos implicó grandes epidemias de enfermedades desconocidas hasta el momento para los Chimane, lo que produjo una sustancial disminución de la población indígena llevándola al borde de la extinción.

Como estrategia ante la llegada de los españoles, los Chimane tuvieron que dispersarse por el bosque y aceptar a los misioneros para obtener medicamentos y otros productos.

Posteriormente, los comerciantes mestizos de San Borja empezaron a recorrer el río Maniquí llevando mercaderías para intercambiarlas con productos provenientes de las comunidades Chimane, lo cual condujo a desastrosas consecuencias para estas últimas. (Lehm, 1993)

El ingreso de la Misión Evangélica Nuevas Tribus a partir de los años 50, marcó un hito de considerables cambios para el pueblo Chimane, entre ellos la creación del Gran Consejo Chimane, que asume la representatividad y defensa de las comunidades Chimane de una forma subjetiva y no aceptada completamente por una buena parte de la comunidad Chimane.

Los Chimane hablan su propia lengua y muchos de ellos también la escriben. Su lengua pertenece al grupo de lenguas Macro Panoanas (Ruhlen, 1991) del tronco Amerindio. La población total está formada por 4126 individuos (Censo Nacional de Bolivia 2001) repartidos en numerosos asentamientos dispersos a lo largo del río Maniquí y afluentes, en Yucumo, Rurrenabaque, Fátima de Chimanos y en el Bosque de Chimanos, siendo pocos los asentamientos que tienen una población mayor a 200 habitantes.

Los Chimane practican un desplazamiento constante dentro su territorio, lo cual les ha valido una falsa imagen de nómadas. Sin embargo ésta es una dinámica propia de su vida cotidiana ligada a procesos de recolección, caza y visitas a parientes.

La base de la organización social es la familia nuclear, conformada por el padre, la madre y los hijos. Debido a que la residencia de los matrimonios recientes es matrilocal, las nuevas parejas suelen permanecer en casa de los padres de la mujer por algunos años, para más tarde independizarse.



Fig. 46 Pequeña comunidad Chimane “Lugar de Victoriano” cerca del río Maniquí. Fot. Francesc Bert

**ASPECTOS BIODEMOGRÁFICOS DE GRUPOS ÉTNICOS MACRO-PANO DE BOLIVIA Y CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DE LAS POBLACIONES AYMARÁ, QUECHUA, CHIMANE Y MOSETÉN**

Se sabe que hace pocas décadas, la poligamia sororal era una práctica común entre los Chimane, pero debido a diferentes razones se ha reducido considerablemente. (Daillant 1994) Anteriormente cada comunidad contaba con el liderazgo del *konkasiqui* quien solo se limitaba a brindar consejos y orientaciones a las familias, pero sin gozar de representación externa ni contar con un poder coercitivo sobre las familias. Las autoridades recientes son los jefes de zona y los corregidores.

Los Chimane son un pueblo de pescadores, cazadores y agricultores. Dependen mucho de las actividades de la pesca y caza. Aunque conocen una variada cantidad de productos cultivados, la pesca es la actividad principal. También pueden dedicarse a la explotación del tejido de la jatata y de distintas especies madereras, cultivo del arroz y venta de artesanía (Castillo, 1988). Los individuos de la etnia Chimane se reconocen entre sí como *chátidye* (pariente). Se caracterizan por ser fieles a sus creencias y costumbres y tienen un amplio conocimiento de la medicina tradicional así como en el ámbito de la artesanía.

Edad Chimane	Hombres	Mujeres
Total	3.032	2.685
0-4	759	650
5-9	523	477
10-14	312	267
15-19	267	273
20-24	239	246
25-29	225	238
30-34	170	139
35-39	163	126
40-44	115	90
45-49	84	53
50-54	53	39
55-59	20	32
60-64	47	25
65-69	19	13
70-74	17	10
75-79	6	5
80-84	6	1
85-89	5	1
90-94	1	0
95+	1	0

Tabla 11. Frecuencias absolutas de individuos por grupos de edad y sexo en la etnia Chimane.

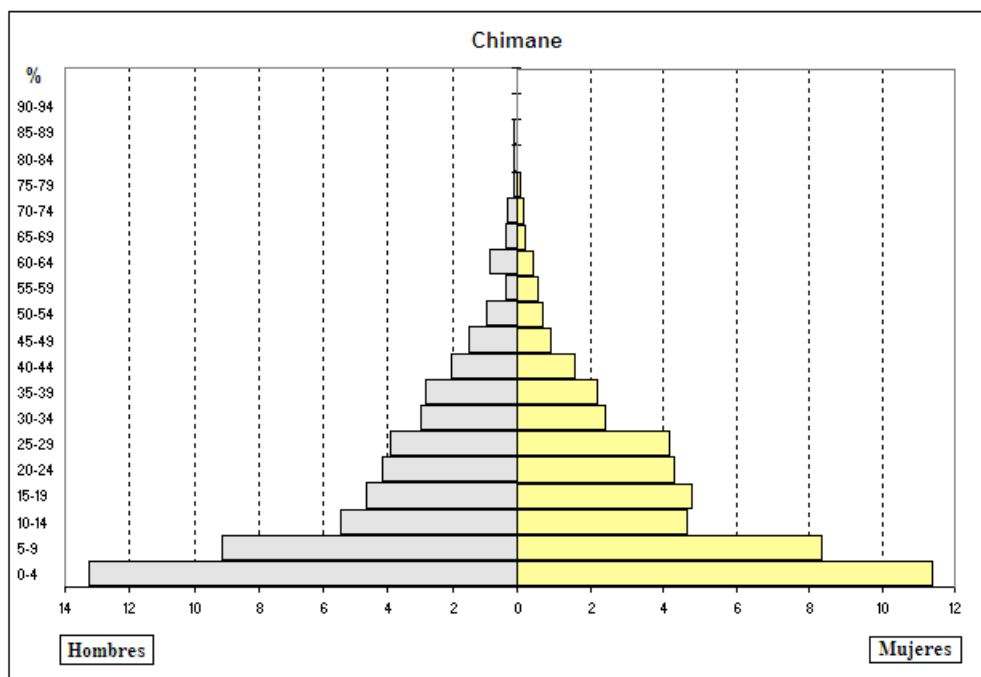


Fig. 47 Pirámide de edad de la población Chimane.

La pirámide de edad se ha elaborado con un total de 5717 individuos de la etnia Chimane residentes en el Departamento del Beni en el Censo Indígena de 1994, se observa una base de la pirámide muy ancha, característica de poblaciones con una supuesta expansión poblacional, con una alta natalidad pero a la vez, con una elevada mortalidad infantil. La proporción de niños entre 0 y 4 años es ligeramente mayor a la de niñas, ésta proporción no se iguala hasta la cohorte de 15-19 años para volver a acusarse en la cohorte de 35-39 años.

El índice de masculinidad, es en general, siempre alto para todas las cohortes y aumenta con la edad, para el grupo de edad 55-59 años, existe una interrupción de la tendencia explicable por un error expreso o no a atribuirse por parte de los hombres una edad mayor a la real.

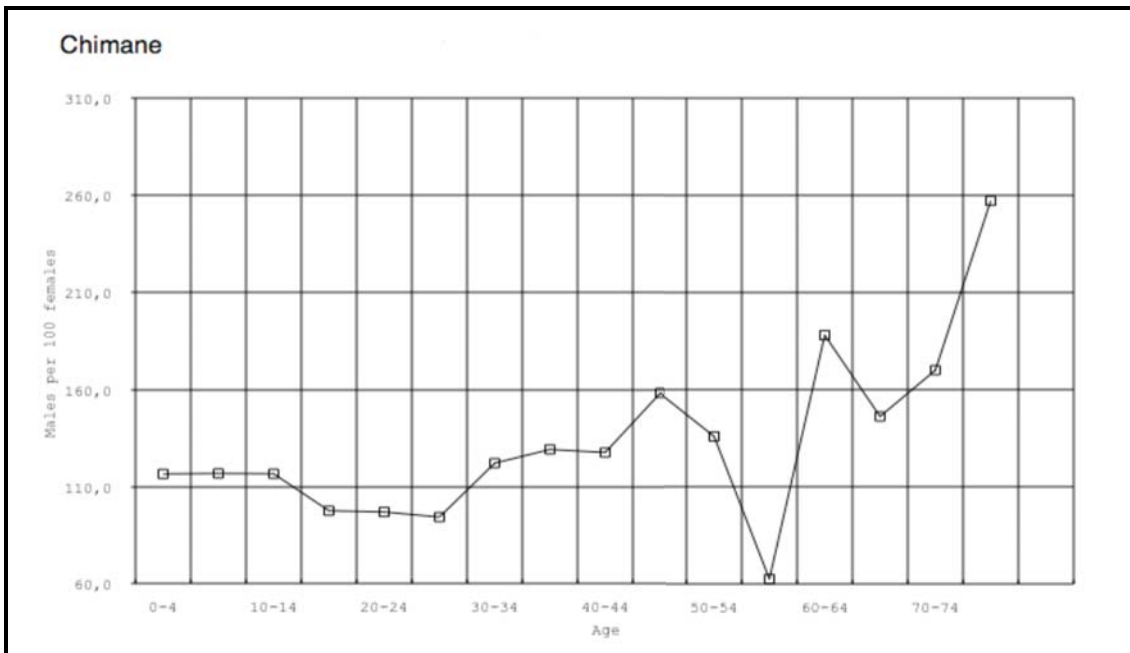


Fig. 48 Valores del índice de masculinidad según grupos de edad en la etnia Chimane.

4.1.2 La etnia Mositén

Desde periodos pre-coloniales, la etnia Mositén ocupó un área definida por la cuenca del río Beni, desde Cotacajes, Santa Elena, Boopi, Inicua y Quiquibey, hasta el actual territorio de Rurrenabaque en el departamento del Beni. Los Mositenes de fueron descritos como familias dispersas, y estacionalmente nómadas.

Según los datos de los últimos censos, la población es de 120 individuos en el Departamento del Beni (Censo 1994), pero se estima que en el Censo de 2001 la población total era de 789 individuos.

Los primeros contactos con los europeos se dieron a través de los misioneros franciscanos. Desde entonces, la vida de los Mositenes estaría estrechamente vinculada a éstos. En 1790, los padres José Jorquera y Agustín Martí fundaron la misión de San Francisco de Mositenes. Una segunda misión aparece en 1805, la cual se denominó San Miguel de Tinendo, ubicada en la actual comunidad de Muchane. Una tercera misión fue fundada en 1815: se trata de la misión de Santa Ana de Alto Beni o Mositenes. Finalmente ya en tiempos republicanos se fundó la misión de Covendo en 1862 (Armentia, 1905).

Durante el siglo XIX y la primera mitad del siglo XX, las misiones siguieron la tarea de evangelizar a los Mositenes. Eventualmente, se tuvieron noticias de viajeros o de

expedicionarios científicos que pasaron por la zona y que dieron cuenta de algún tipo de información sobre este grupo étnico.

En el presente siglo, un hecho que impactaría notablemente en la vida de los Mosevenes fue la colonización de la zona por parte de población del altiplano a partir de los años 60. Los colonos se introdujeron en la zona, arrinconando a los Mosevenes a zonas marginales de su antiguo territorio. En 1972, el Estado y la iglesia dieron por concluido el régimen de misión en las comunidades de Covendo y Santa Ana, iniciándose con ello la asimilación de los Mosevenes a la sociedad boliviana.

Los Mosevenes són un pueblo con una alta movilidad. Las migraciones de la etnia Mosevén son habituales por varias causas: falta de tierras, trabajos asalariados eventuales o estudios. Este fenómeno se da más en la población adolescente y joven. Las primeras causas se relacionan con la continua presión sobre los recursos naturales, que empuja a los Mosevenes a buscar otras formas de vida.

La etnia Mosevén habla una lengua propia de la familia Macro Panoana (Ruhlen 2001).

La forma de organización social es neolocal en familias nucleares, aunque también existen familias extensas. El número de hijos que tiene una mujer Mosevén se puede elevar hasta 10. Los apellidos Mosevenes informan de que comunidad procede cada miembro y que relación de parentesco existe entre ellos (Montaño, 1987)

La comunidad está vinculada mediante el parentesco consanguíneo y el ritual, como el compadrazgo, hecho que rige algunas normas de convivencia. Algunas comunidades están nucleadas, como Asunción del Quiquibey, Santa Ana, Muchane, Inicua, mientras que en Covendo, los Mosevenes están asentados en comunidades dispersas.



Fig. 49 Comunidad Mositén de la aldea de Santa Ana de Yacuma

La autoridad máxima en cada comunidad está constituida en orden de jerarquía y autoridad por el cacique, el segundo cacique y los comisarios. Desde 1994, las comunidades Mositenes conforman la Organización del Pueblo Indígena Mositén (OPIM).

La principal actividad económica es la agricultura, aunque existen familias cuyas actividades principales siguen siendo las tradicionales (caza, pesca, recolección). También surgen nuevas actividades económicas como la venta de la mano de obra como jornaleros a las empresas madereras. Caza, pesca y recolección de productos silvestres (Aguilar, 1990).

La explotación indiscriminada de las maderas preciosas origina una notable disminución y la casi desaparición de la caza y la pesca en el territorio Mositén. Otro problema grave es la ampliación de la frontera agrícola, lo que significa que cada año se cultiven extensas zonas de bosques, con el consiguiente daño ecológico.

Edad Mositén	Hombres	Mujeres
Total	57	53
0-4	12	16
5-9	5	14
10-14	6	1
15-19	7	6
20-24	6	3
25-29	2	5
30-34	6	2
35-39	3	2
40-44	4	2
45-49	0	0
50-54	2	1
55-59	1	0
60-64	1	1
65-69	0	0
70-74	2	0

Tabla 12. Frecuencias absolutas de individuos por grupos de edad y sexo en la etnia Mositén.

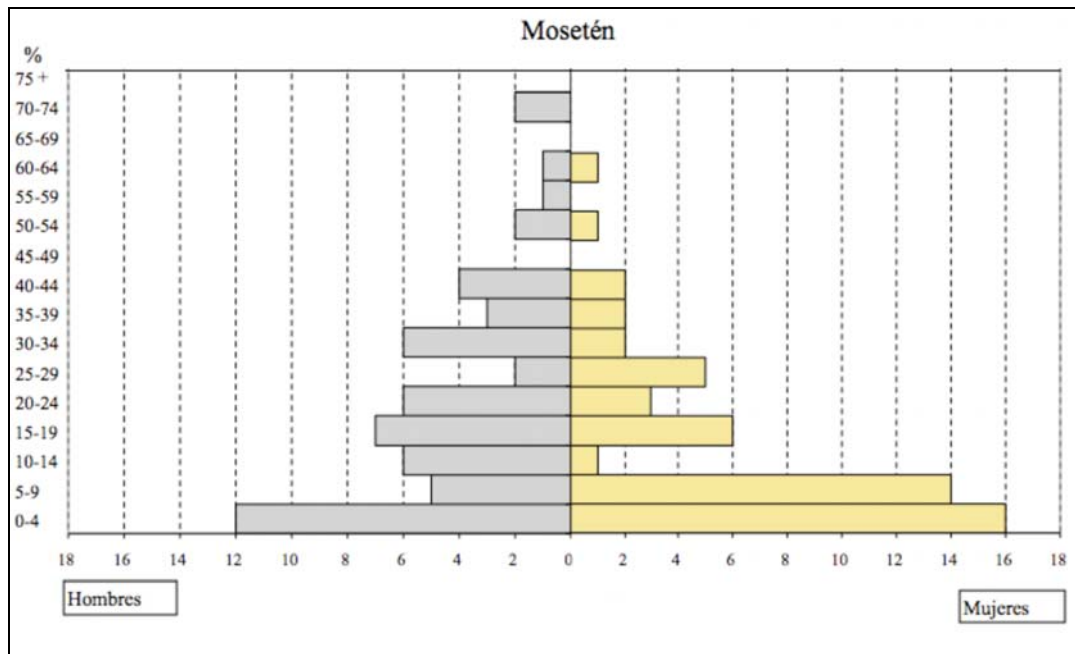


Fig. 50 Pirámide de edad de la población Mositén.

La pirámide de edad se ha elaborado con un total de 110 individuos de la etnia Mositén residentes en el Departamento del Beni en el Censo Indígena de 1994. Debido al pequeño tamaño muestral, tanto la pirámide de edad como los valores del índice de

masculinidad carecen de significación poblacional, pero apuntan hacia una migración de género femenino hacia otras regiones y/o una llegada de masculina a dichas comunidades. De hecho, la población Masetén es la que presenta una mayor proporción de hombres nacidos fuera de la comunidad en el momento de realización de la encuesta.

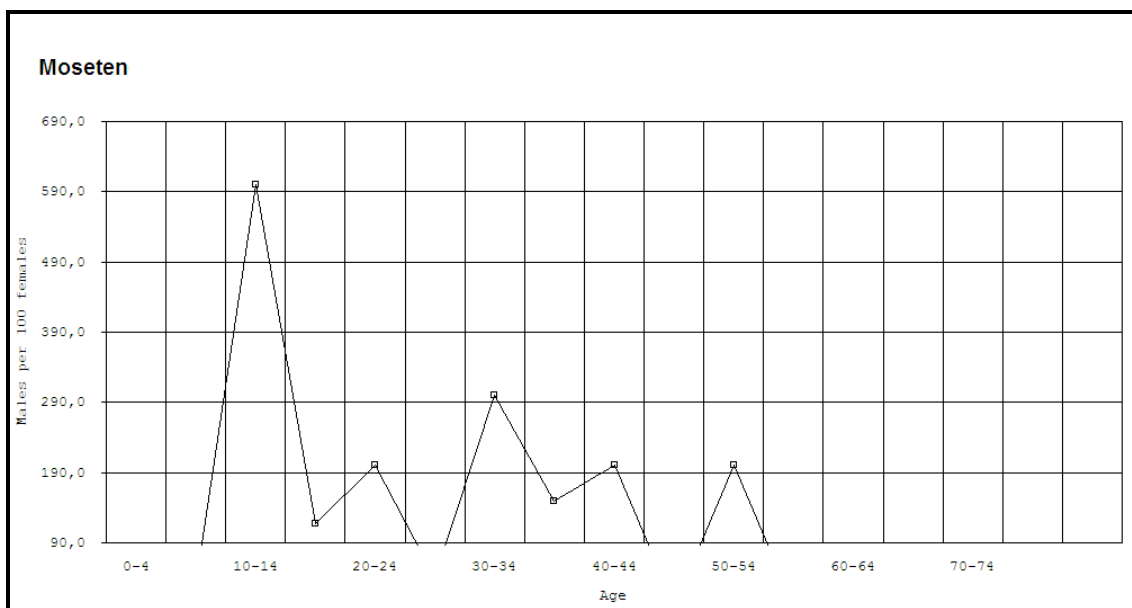


Fig. 51 Valores del índice de masculinidad según grupos de edad en la etnia Masetén.

4.1.3 La etnia Chacobo

Las primeras referencias a esta etnia fueron escritas por cronistas del siglo XVIII que los ubicaron en las inmediaciones del lago Rogaguadoy, los escritos hacen referencia a numerosos enfrentamientos de esta etnia con otros grupos vecinos como Cayubaba, Sirionó y Movima.

En 1.868 Armentia describe que encuentra varios Chacobo sobre el río Ivon, en comunicación con los del lago Rogaguado y otras familias en el arroyo Geneshuaya (Armentia, 1905). A partir de 1.909 se conoce más directamente la vida de este grupo humano (Nordenskiold, 1922). La población es de 747 individuos según el censo de 1994. Su economía se base en la agricultura de subsistencia y sigue el modelo panamazonico de *roza-tumba-quema*, con el obvio complemento, de la caza, la pesca y la recolección. Cada familia puede cultivar (cítricos, papayas) incluyendo en menor medida la caña de azúcar (Boom, 1989).



Fig. 52 Padre e hijo Chacobo cerca de Trinidad, mediados s. XX Fot. Alberto Tardio

Los Chacobo desde hace más de tres décadas mantienen una experiencia comercial con el caucho, cuya venta siempre ha sido desventajosa para ellos. Últimamente se ha incorporado a la venta la castaña, pero siempre en condiciones muy desventajosas para las comunidades Chacobo, ya que los comerciantes pagan precios de sobreexplotación o sencillamente entregan especias (principalmente alcohol) a cambio de los productos.



Fig. 53 Campo sometido al “tumba, roza y quema” cerca de San Borja. Fot. Francesc Bert

Los asentamientos más importantes Chacobo son: Alto Ivon, Núcleo, California y Motacuzal, que se ubican en la margen derecha del arroyo Ivon, las tres primeras y la cuarta sobre la margen izquierda del mismo arroyo, pero a unos 30 Km de Alto Ivon. Existen grupos familiares o unidades domésticas que se asientan en el río Yata. De hecho la comunidad más importante es Alto Ivon.

Las comunidades Chacobo son sedentarias con alternancia de períodos de nomadismo, particularmente cuando se abandonan chacos al barbecho para buscar nuevas tierras de cultivo. El patrón familiar básico es el de la familia nuclear, monogámica, preferente endogámica, aunque en los últimos tiempos se van admitiendo algunos matrimonios exogámicos. Los Chacobo se caracterizan por mantener formas de reciprocidad y lazos de solidaridad importantes entre familias y comunidades. La filiación y descendencia es patrilineal.

Los Chacobo acogieron en su tierra (Alto Ivo), a ocho miembros del grupo étnico Pacahuara, también de filiación lingüística Pano que al principio llevaban una vida independiente pero que poco a poco se integraron al entorno Chacobo (García, 1997)

La autoridad tradicional, ya en desuso, estaba constituida por un jefe, que además de ser elegido por el prestigio lo era por sus dotes chamánicos. Actualmente para las cuestiones internas de la vida comunal se apela a la opinión de los ancianos y para las relaciones con el

mundo externo se elige a cualquier persona que tenga una alta capacidad para relacionarse oralmente con las autoridades o los Miembros de la Misión Suiza-Alemana, esta misión ha sido la que después del SIL ha venido influyendo mayoritariamente en el curso de las decisiones importantes de las comunidades. Las funciones se realizan en la pequeña Iglesia del "Culto" evangelista: Se observa una relación no siempre armónica entre las opiniones e influencias de evangélicas y los Chacobo (Rivero, 1994).

El mundo espiritual de los Chacobo era muy rico en expresiones míticas: hoy la influencia de las misiones lo ha empobrecido, creando una situación de ambigüedad en las relaciones nativas con la naturaleza y lo sobrenatural.

A comienzos de la década del 70 los Chacobo recibieron en dotación 43.000 hectáreas de territorio, lo que sin embargo restringía la extensión en la que tradicionalmente se habían movido; esta dotación se ubica al centro de la provincia Vaca Díez y a unos 220 Km de Riberalta. Cabe decir que dentro de las tierras de los Chacobo han vivido tradicionalmente desde los años 70 numerosos colonos con su aprobación (Keim 1970)

Edad Chacobo	Hombres	Mujeres
Total	395	351
0-4	104	69
5-9	60	63
10-14	53	32
15-19	25	46
20-24	36	36
25-29	25	32
30-34	29	21
35-39	16	22
40-44	11	8
45-49	15	8
50-54	3	4
55-59	3	3
60-64	7	2
65-69	1	2
70-74	3	1
75-79	1	1
80-84	2	1
85+	1	0

Tabla 13. Frecuencias absolutas de individuos por grupos de edad y sexo en la etnia Chacobo.

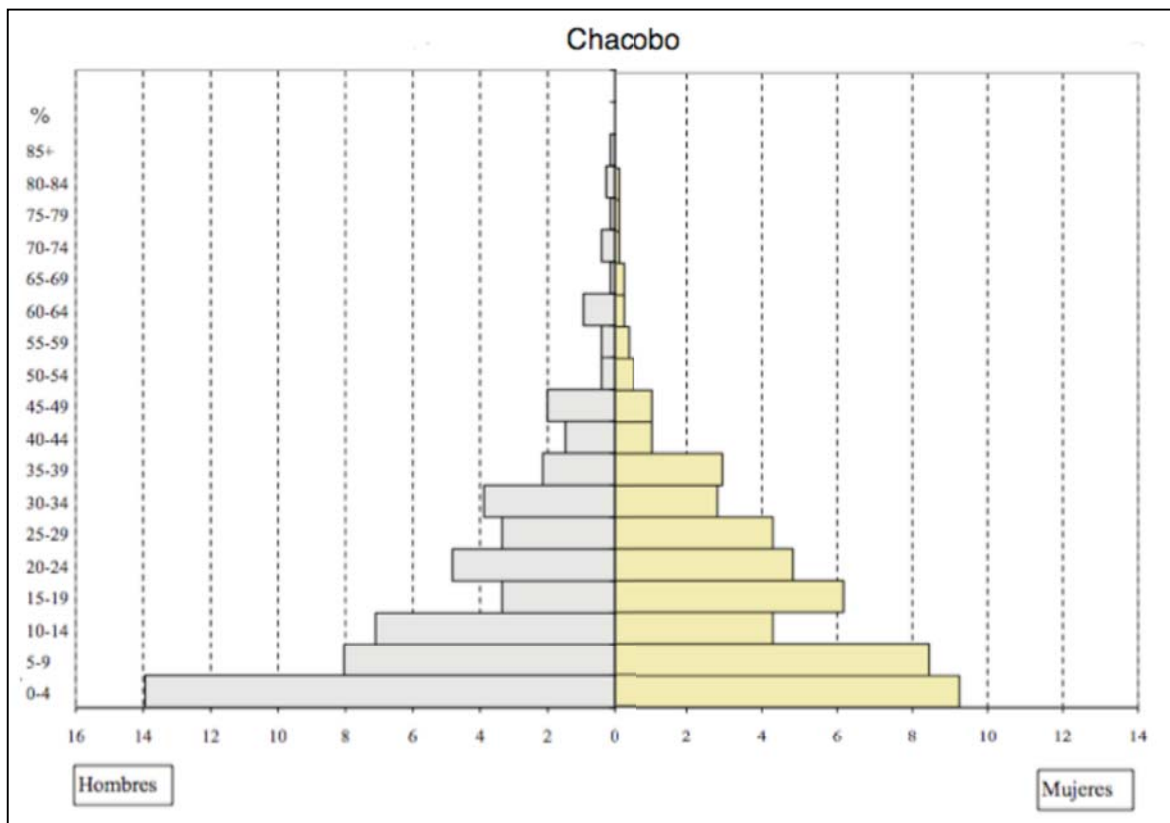


Fig. 54 Pirámide de edad de la población Chacobo.

La pirámide de edad se ha elaborado con un total de 746 individuos de la etnia Chacobo residentes en el Departamento del Beni en el Censo Indígena de 1994. La base de la pirámide es ancha, característica de poblaciones en proceso de expansión y en la primera cohorte (0-4 años) presenta una clara desviación de género con una proporción de un 14% de niños respecto un 9% de niñas, esta desviación se repite en el rango 10-14 pero se compensa en la siguiente cohorte (15-19 años). Estos resultados se podrían explicar por una mala determinación de la edad real de los individuos por parte del encuestador.

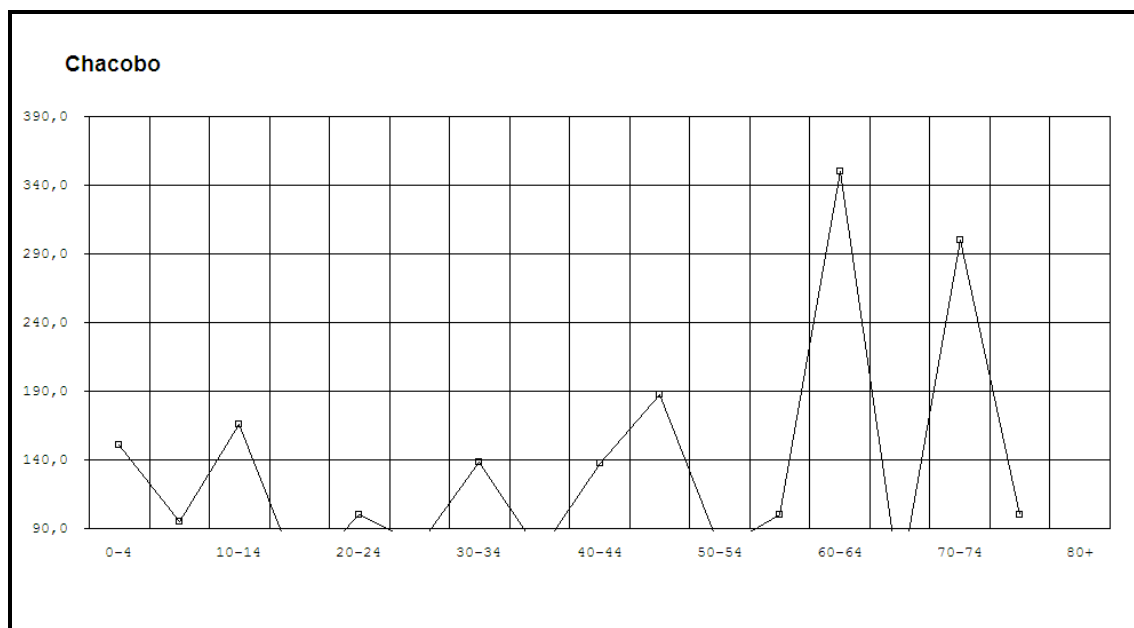


Fig. 55 Valores del índice de masculinidad según grupos de edad en la etnia Chacobo.

4.1.4 La etnia Cavineño

Las primeras referencias de esta etnia se remontan al padre Eguiluz (1.662). Los franciscanos los trasladaron desde el Río Madre de Dios, hasta la antigua misión de Cavinás, en el río Madidi; posteriormente se asentaron a orillas del río Beni (Cardús, 1886). Se sabe por Metraux (1948) que en 1.832 habían un millar de Cavineños en la población de Cavinás, pero la población disminuyó durante la época del caucho. En el censo de 1994 la población era de 1288 individuos.

La economía de los Cavineños se basa fundamentalmente en la agricultura de subsistencia: plátano, maíz, yuca, arroz. Hay extracciones de goma y castaña. La ganadería familiar a pequeña escala, la cría de animales domésticos, se complementa con la caza y en menor medida la pesca. Extraen goma y castaña para su comercialización, por las cuales reciben el pago en especies a precios muy inferiores a su valor real.

En general todas las comunidades mantienen el patrón de asentamiento semi-itinerante, con un centro común sobre el que van rotando. La familia es nuclear, aunque se admite la bigamia esporádica del varón. La residencia es matriarcal y neolocal por el seminomadismo. La herencia es patrilineal.

Actualmente las formas de organización de la autoridad tradicional se ha reducido a la consulta a los más ancianos de cada comunidad, en casos de necesidad extrema,

virtualmente no existe autoridad ritualizada y mantenida como parte de la estructura social. Sin embargo se puede ver que existe conciencia de la falta de una organización común de los Cavineños, al haberse creado muy recientemente un "Comité de Defensa y recuperación de la Tierra", y que más que una autoridad sociopolítica representa un mecanismo de relación con el Estado de parte de las comunidades.

Respecto de los aspectos ideológicos de los Cavineños se observa que ha habido un drástico abandono de sus creencias religiosas tradicionales en los últimos treinta años, según lo admiten los ancianos. La actividad de las misiones evangélicas (ahora la Misión Suiza-Alemana) ha sido intensiva. Se dice que aún puede recuperarse un cierto corpus mítico entre los Cavineño, en los que se encontraría aún la pervivencia del animismo generalizado. La lengua de los Cavineño es conservada en una proporción alta, lo que confiere unidad al grupo étnico entre sus diferentes comunidades (Lieberman y Godinez 1992).

Edad Cavineño	Hombres	Mujeres
Total	665	623
0-4	134	115
5-9	102	108
10-14	105	98
15-19	59	63
20-24	40	41
25-29	44	44
30-34	43	35
35-39	32	36
40-44	29	29
45-49	20	12
50-54	19	14
55-59	12	7
60-64	10	7
65-69	7	4
70-74	2	7
75+	7	3

Tabla 14. Frecuencias absolutas de individuos por grupos de edad y sexo en la etnia Cavineño.

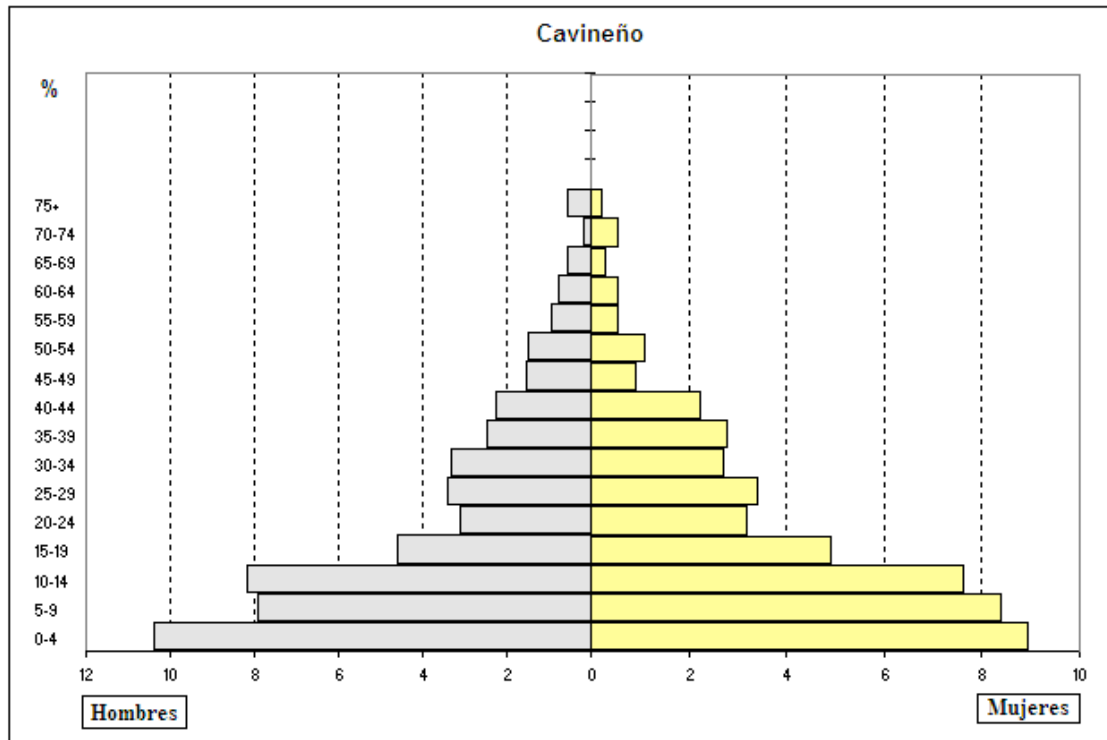


Fig. 56 Pirámide de edad de la población Cavineño.

La pirámide de edad se ha elaborado con un total de 1288 individuos de la etnia Cavineño residentes en el Departamento del Beni en el Censo Indígena de 1994. Como en otras poblaciones estudiadas con tamaños muestrales representativos, la población Cavineña presenta una elevada natalidad y una alta mortalidad infantil.

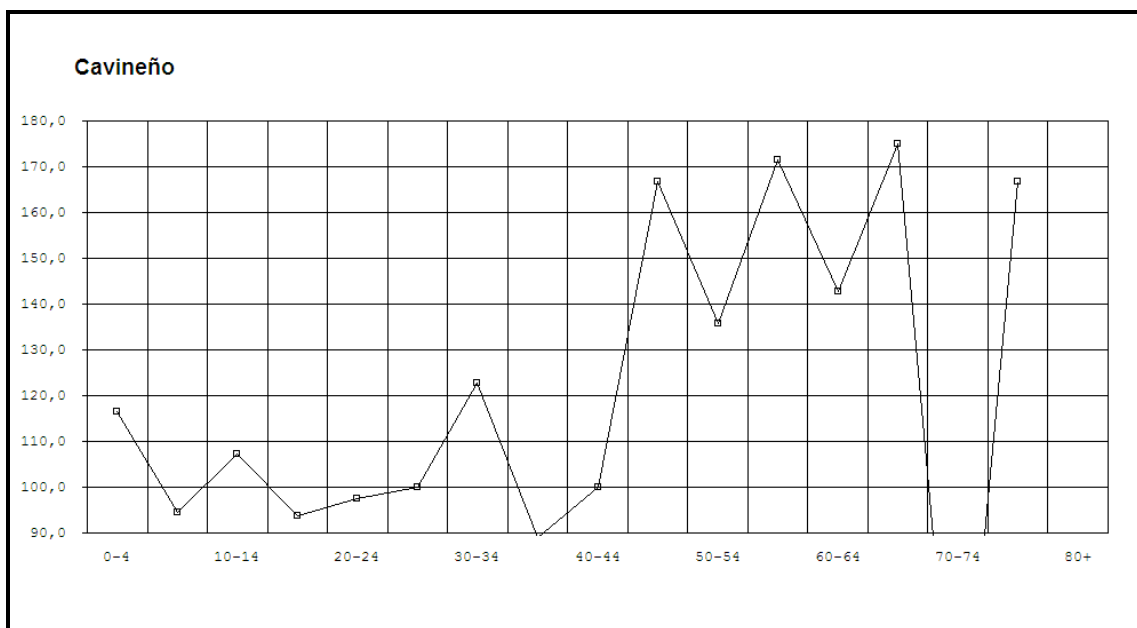


Fig. 57 Valores del índice de masculinidad según grupos de edad en la etnia Cavineño.

4.1.5 La etnia Tacana

La etnia Tacana mantuvo el primer contacto con los españoles en 1539, cuando éstos penetran en su territorio en búsqueda de El Dorado o Paitití. En 1680, los misioneros franciscanos empezaron a concentrar la población indígena de Apolobamba en tres reducciones, pero el impacto mayor sobre esta población se produjo durante los años 1850 y 1860, cuando el auge de la quina causó una fuerte demanda de trabajadores en la zona de los Yungas, provocando la emigración forzada de los Tacana (Wentzel 1989). Otro impacto negativo fue el auge de extracción de la goma, desde 1880; afectó todo el Norte de Bolivia (Chiovolone, 1996). Hacia el año 1910, ya no había más de 100 familias en las poblaciones de Ixiamas, San José y Tumupasa.



Fig. 58 Mujer y niños de la etnia Tacana.

Los Tacana son agricultores sedentarios, sus actividades de cacería y pesca aún son importantes. Su población es de 1470 individuos en el Beni pero llega a 3452 si se tienen en cuenta otros Departamentos.

La descendencia y la herencia se rigen patrilinealmente; la residencia puede ser con los suegros o en una casa independiente. La autodefinición de ser miembro del pueblo Tacana está relacionada al grado de endogamia. La mayoría de los matrimonios se forman dentro de las comunidades, por falta de alternativas; aunque actualmente existe migración de los jóvenes por motivos de educación y búsqueda de mejores condiciones de vida.

Aún existe el sistema de autoridades políticas tradicionales; es una modificación de la administración local introducida por los Franciscanos y el gobierno nacional. Cargos políticos: corregidor y cacique; son elegidos anualmente entre la población adulta masculina.

Son ejecutores de las decisiones comunales tomadas en reuniones de la población con participación de las mujeres. Desde 1970 también participan o intervienen instituciones políticas modernas, como agencias municipales o cantonales, comités cívicos, sindicatos, etc. Sus funciones son poco definidas y poco vinculantes (Romero, 1991).

Paralela a la vida religiosa católica, pero oculta, persiste la institución del chamán. No solamente son curanderos con amplios conocimientos medicinales, sino guardianes del bienestar de la comunidad y su entorno. Con sus ceremonias periódicas en casas de culto secretas, protegen a las nuevas autoridades y la comunidad en general durante un nuevo año y velan sobre las labores del ciclo agrícola desde el chaqueo hasta la cosecha (Ottaviano, 1980).

Los pueblos o asentamientos principales son: Ixiamas, Tumupasa y San Buenaventura. Comunidades: Tahua, Napashi, El Carmen. Diseminados por los ríos Orton, Beni y Madre de Dios, con asentamientos menores a lo largo de las riberas: desde Rurrenabaque hasta Riberalta, llegando incluso hasta el Brasil.

Edad Tacana	Hombres	Mujeres
Total	772	697
0-4	149	152
5-9	137	113
10-14	124	78
15-19	84	78
20-24	36	52
25-29	43	60
30-34	39	38
35-39	52	21
40-44	28	31
45-49	20	25
50-54	23	15
55-59	8	14
60-64	14	6
65-69	6	4
70-74	3	6
75-79	4	3
80+	2	1

Tabla 15. Frecuencias absolutas de individuos por grupos de edad y sexo en la etnia Tacana.

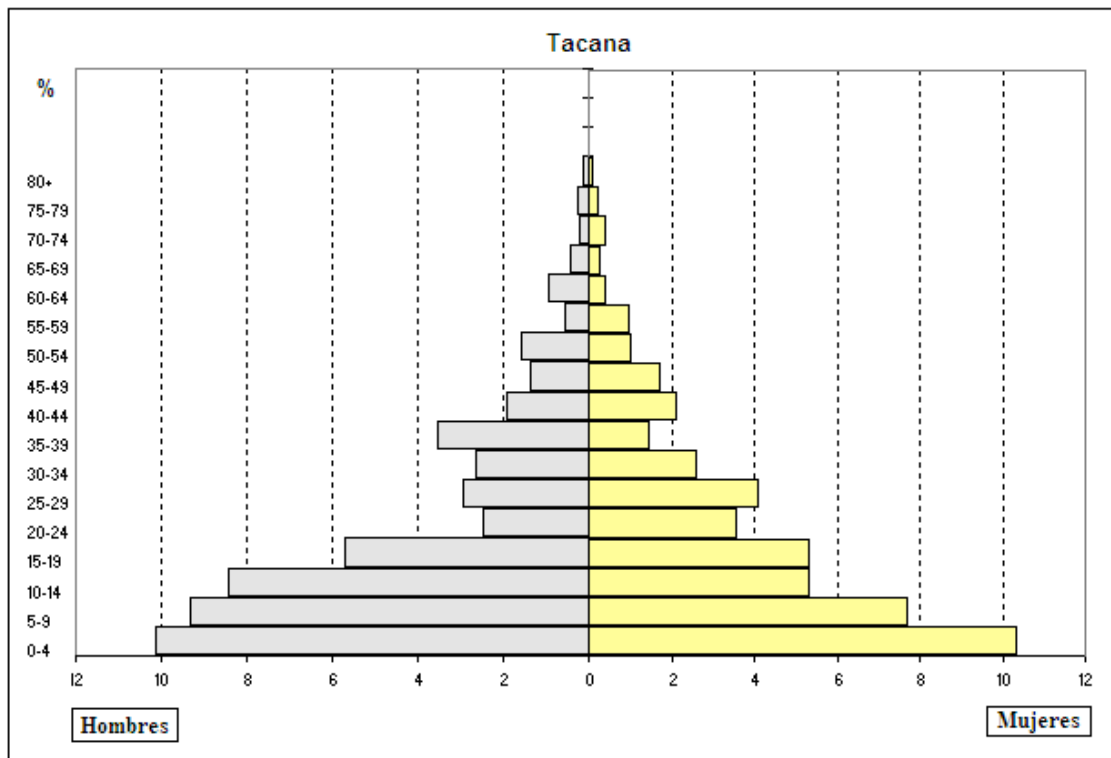


Fig. 59 Pirámide de edad de la población Tacana.

La pirámide de edad se ha elaborado con un total de 1469 individuos de la etnia Tacana residentes en el Departamento del Beni en el Censo Indígena de 1994. En la pirámide de edad de la población se repite el patrón de una elevada natalidad combinado con una alta mortalidad infantil, por otro lado se observa una reducción importante en la población masculina en la cohorte 20-24 años que se explica por la migración de ésta a otros lugares, principalmente pueblos y ciudades en busca de prosperidad económica.

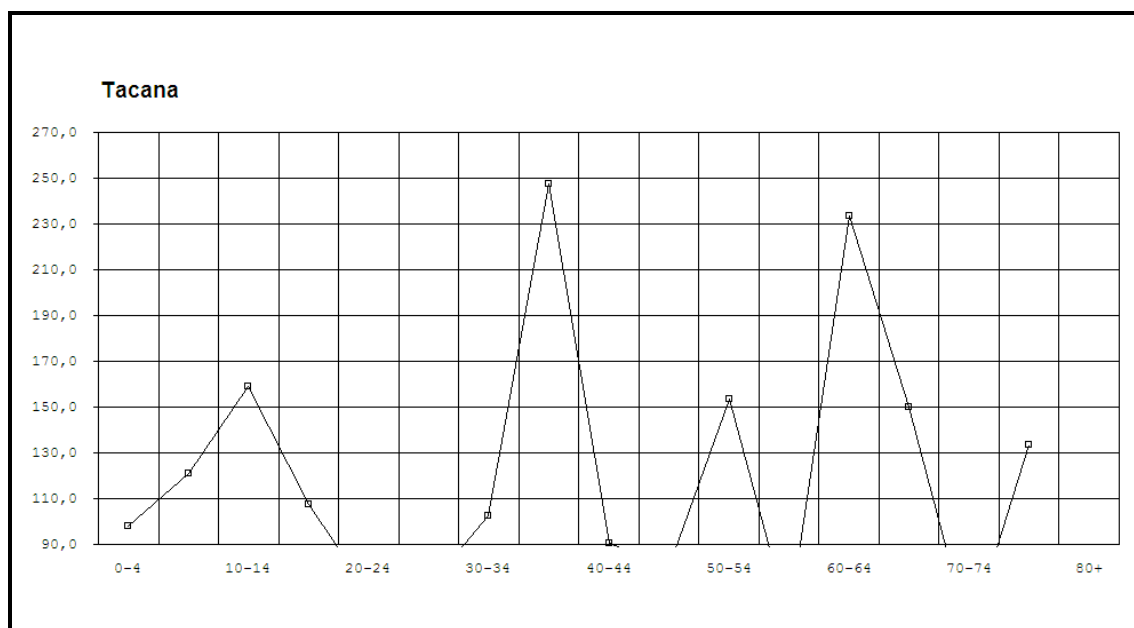


Fig. 60 Valores del índice de masculinidad según grupos de edad en la etnia Tacana.

4.1.6 La etnia Maropa

La etnia Maropa o Reyesana como también se les llama está constituida por unos 4034 individuos ubicados en el Departamento del Beni, en la provincia de Ballivián, básicamente se encuentran vinculados a dos ciudades, Reyes y Santa Rosa. Su lengua es la Tacana perteneciente al tronco amerindio Pano-Tacana (Ruhlen 1991). Las actividades económicas principales son la ganadería, la agricultura y la silvicultura, complementada con la artesanía en pieles y palmas. También cazan y pescan con fines de supervivencia. La región donde viven los Maropas o Reyesanos son llanuras con bosques de galería, surcada por ríos y lagos de la cuenca amazónica. Existen muchos pastizales naturales y es rica en biodiversidad. El clima es cálido y con precipitación pluvial media.

La historia de la etnia Maropa está íntimamente vinculada a la antigua Misión de Los Santos Reyes, que fue creado con el objetivo de evangelizar a los grupos indígenas del área ubicada entre el río Beni y el lago Rogaguado. Las comunidades han estado históricamente vinculadas a la explotación y comercio de la quinina y posteriormente, cuando fueron desplazados más al norte fueron utilizados como mano de obra en la explotación del caucho.

ASPECTOS BIODEMOGRÁFICOS DE GRUPOS ÉTNICOS MACRO-PANO DE BOLIVIA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES AYMARÁ, QUECHUA, CHIMANE Y MOSETÉN

Edad Maropa	Hombres	Mujeres
Total	2.134	1.897
0-4	377	408
5-9	378	336
10-14	312	278
15-19	227	193
20-24	173	127
25-29	107	108
30-34	111	91
35-39	84	84
40-44	92	64
45-49	75	58
50-54	58	45
55-59	34	40
60-64	48	30
65-69	22	16
70-74	19	7
75-79	13	7
80-84	1	3
85+	3	1

Tabla 16. Frecuencias absolutas de individuos por grupos de edad y sexo en la etnia Maropa.

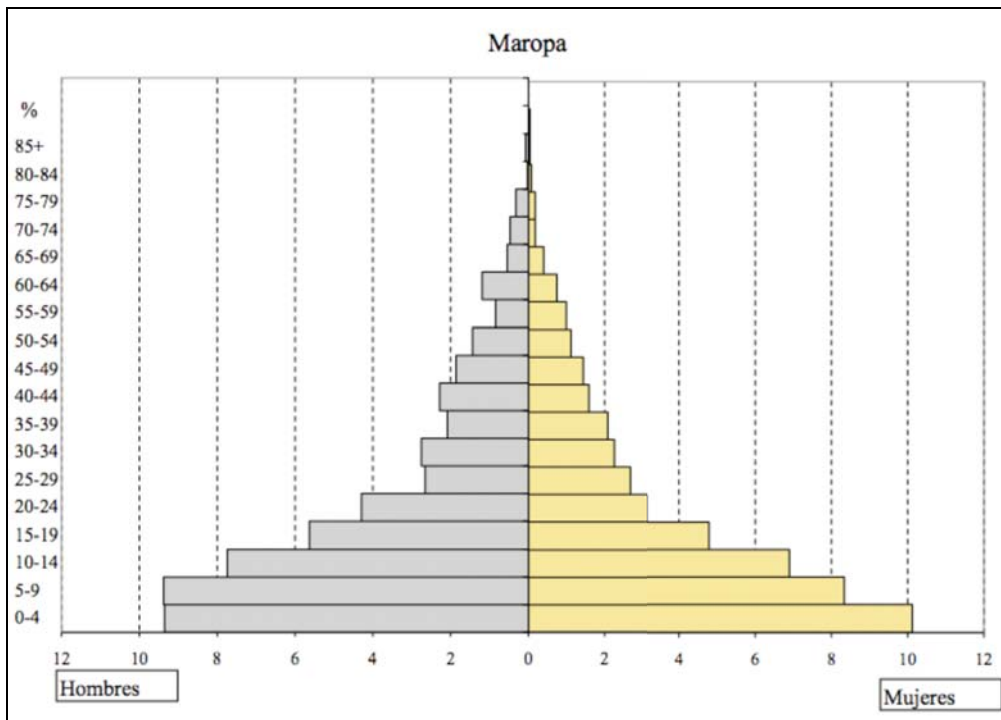


Fig. 61 Pirámide de edad de la población Maropa.

La pirámide de edad se ha elaborado con un total de 4031 individuos de la etnia Maropa residentes en el Departamento del Beni en el Censo Indígena de 1994. En la pirámide se puede observar que aproximadamente 30% de la población es menor de 20 años.

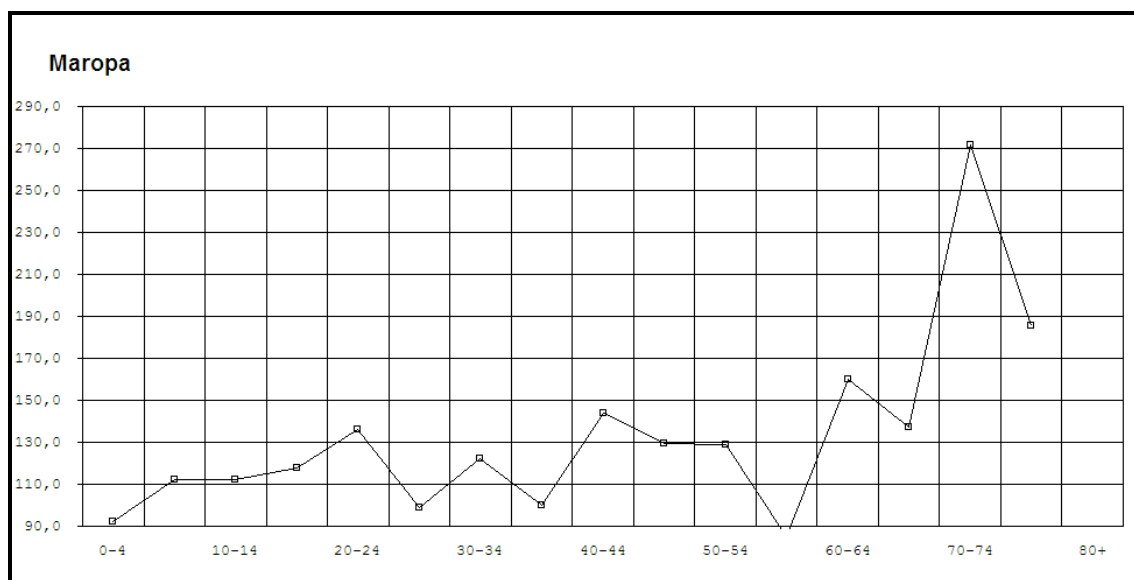


Fig. 62 Valores del índice de masculinidad según grupos de edad en la etnia Maropa.

4.1.7 La etnia Esse-Ejja

En 1.686 los Franciscanos entraron en contacto con distintas poblaciones de habla Tacana entre las que había los Esse-Ejja en la parte superior del río Tambopata (Perú). Nicolás Armentía en 1.887 los visitó en un conjunto de planicies entre Ixiamas y Cavinás y a orillas del Río Madidi. A principios de este siglo se dividieron en tres grupos los Bahuajja (río Tambopata y Madre de Dios) Los Sonenes (Río Heath) y los Ese-Ejja extendidos a lo largo del río Beni (Shomaker, 1975).

Los Esse-Ejja son un grupo que presenta comunidades que se encuentran en aislamiento voluntario

La población era de 61 individuos en el Departamento del Beni, y teniendo en cuenta otros Departamentos era de 396 individuos según el censo de 2001.



Fig. 63 Niño Esse-Ejja con *Atheles sp.* Fot. Alejandro Arujo

Los Esse-Ejja basan sus actividades productivas en la caza, la pesca y la recolección. Dependiendo cada vez más de la agricultura de subsistencia. Poseen conocimientos especializados en la caza y la pesca, actividad esta última en la que se distinguen por sus grandes "partidas", con las que obtienen excedentes que comercializan en el mismo río Beni.

Otras actividades económicas limitadas son la comercialización eventual de excedentes de la pesca tradicional, y a la venta de ciertas artesanías (palma). También se ha observado una presencia de esta etnia como peones y jornaleros.

El nomadismo ha sido una de las características básicas de los Esse-Ejja, este nomadismo se concentra a orillas de los ríos. Actualmente su patrón de residencia es sedentario, las comunidades mas grandes son Portachuelo Alto y Portachuelo Bajo.

Socialmente se organizan alrededor de un líder, el alcance de la autoridad de éste era amplio e incluía la solución de conflictos entre distintas partes. Ahora debido a la influencia de las misiones evangélicas, aunque la elección del jefe de cada comunidad se sigue realizando por consenso, priman los criterios de la castellanización y mayor "instrucción" religiosa cristiana del candidato así como su capacidad para relacionarse con la población colona, todo ello dentro de una conceptualización de que la etnia requiere de mayor protección frente a la sociedad externa. Aún tiene vigencia la autoridad comunal mayor, al

punto que se mantienen en el presente un cacique general para todos lo Esse-Ejja. Las autoridades estatales no intervienen mayormente en la vida cotidiana de las comunidades.

Las referencias anteriores pueden completarse anotando que el papel de la endogamia es importante en la vinculación y flujo de matrimonios entre las comunidades Esse-Ejja, que resultan en vinculaciones exogámicas clánicas. Ello incide sin duda en un refuerzo de la autoridad mayor de la etnia, que por otra parte vive cada vez mayores presiones foráneas para desvirtuar este tipo de organización social (Fluger et al. 1994).

En la cabecera del río Colorado (Dpto. de La Paz) se encuentra la montaña Bahuajja que los Esse-Ejja consideran sagrada por lo que cada de los miembros de la étnia la visita por lo menos una vez en la vida.

Los Esse-Ejja mantienen en un alto porcentaje el uso de su lengua; aprenden el castellano bajo el sistema selectivo del aprendizaje simultáneo de las lecturas bíblicas el conjunto de sus creencias tradicionales animistas son combatidas por los misioneros pero forman aún parte de su vida espiritual. Tienen aún prácticas de medicina tradicional ligadas a la magia, aunque las enfermedades foráneas la están relegando de la ideología.

Las comunidades se distribuyen en el margen derecho del río Beni: Bala, Copaina, San Marcos Abandonada, Peña, Huarayos (Dpto. del Beni) en el margen izquierdo del Río Beni: Puerto Salinas; en el Río Madidi: Barracon (Dpto. La Paz); Río Beni, Fortaleza, Abandonado, Villanueva, Portacuelo Alto y Portachuelo Bajo (Dpto. Pando).

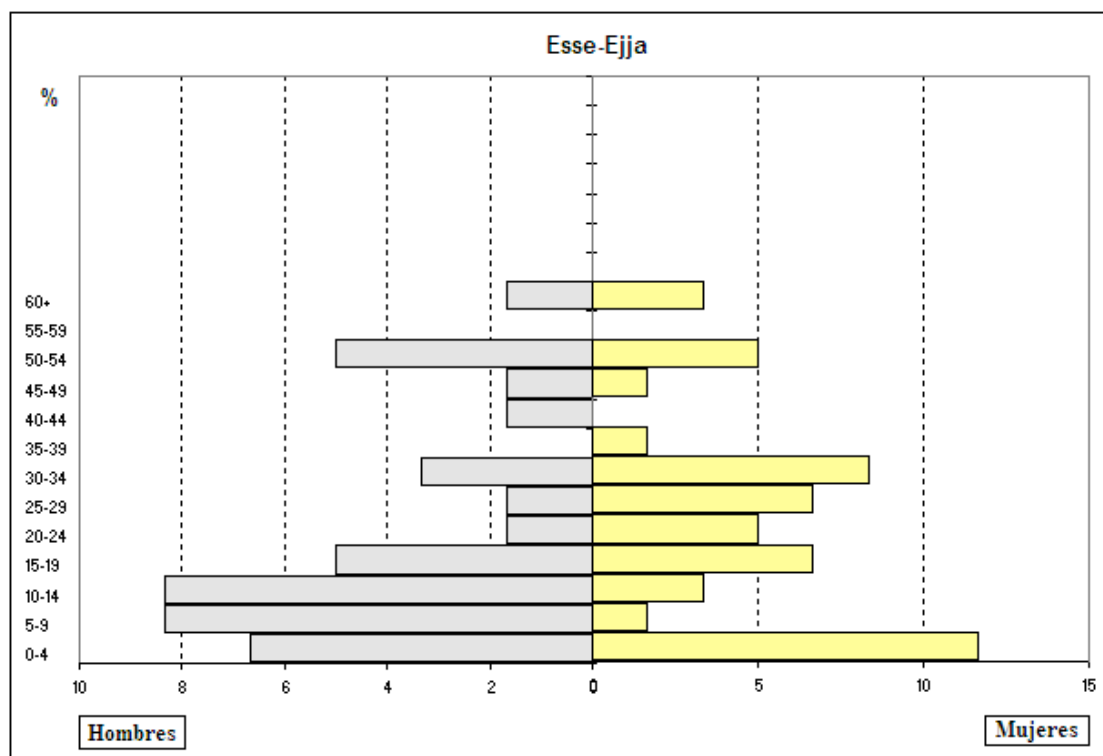


Fig. 64 Pirámide de edad de la población Esse-Ejja.

La pirámide de edad se ha elaborado con un total de 60 individuos residentes en el Departamento del Beni en el Censo Indígena de 1994. El tamaño de la muestra es pequeño, de manera que tanto la pirámide de edad como los valores del índice de masculinidad carecen de significación poblacional.

4.1.8 La etnia Quechua

La etnia Quechua de Bolivia esta conformada por más de 1.500 000 habitantes, su ecoregión natural es la Andina en los Departamentos de: Chuquisaca, Cochabamba, Potosí, Oruro y La Paz pero tradicionalmente han ocupado los valles templados de la cordillera andina. La lengua Quechua pertenece al grupo de lenguas andinas (Ruhlen 2001). Su agricultura se basa en el cultivo de productos como el maíz, patatas, trigo, hortalizas, cebada y quinua.

La organización social de las comunidades Quechuas, se basa en la familia nuclear formada un grupo endógamo sin embargo, en la actualidad esta endogamia se debe más a las inevitables limitaciones físicas de las relaciones entre individuos que a regulaciones propiamente culturales. Además, con la creciente fragmentación de comunidades cada vez

resulta más difícil que las nuevas comunidades sigan siendo endógamas. Por todo ello desde el pasado siglo el número de uniones intercomunitarias ha ido aumentando lentamente. Lo más corriente es que sea la mujer quien proceda de otra comunidad, pero lo contrario también es común.

Hay una gran vinculación entre los parientes, sobre todo los más cercanos. La red de parentesco funciona como un seguro para la familia para las diversas necesidades, por otra parte, es uno de los factores aglutinantes de las diversas familias de la comunidad o al menos de una parte importante de ella. Cada individuo va aumentando su prestigio en la comunidad desempeñando ciertos cargos y obteniendo autoridad y rodeándose de una estela de parientes, yernos-nueras y ahijados (Albó, 1998). Rige la tendencia de no permitir uniones entre parientes tanto maternos como paternos hasta después de cuatro generaciones.



Fig. 65 Mujeres Quechua en La Paz. Fot. Francesc Bert

Las creencias Quechua está íntimamente relacionadas con la actividad agrícola, mediante rituales agrarios consiguen favores de la Pachamama (La madre tierra). Los Quechua, tienen su propia concepción del tiempo y del espacio, que están representados en tres mundos: El kay pacha (nuestro mundo) el mundo de los humanos, donde se desenvuelven los seres vivos, todo lo que nos rodea y puede ser palpable, el suelo, los

sembradíos, etc. El Janaq pacha (mundo de arriba), es el lugar donde habitan Dios y sus santos; el sol, la luna y las estrellas y el Uru pacha que corresponde al mundo de los muertos o subterráneo (Dransart, 1996).

La economía de la población quechua, se basa en la minería y la agropecuaria, la producción agropecuaria varía de acuerdo al piso ecológico donde habitan.

En el Altiplano las actividades principales son la agricultura, minería y la ganadería de camélidos, ovino y bovino. La agricultura es esencialmente de tubérculos como la patata y cereales como la quinua, kanawa y cebada. En los Valles, las actividades principales son la agropecuaria, la avicultura y la floricultura. Se dedican a la agricultura de, maíz, patata, hortalizas; crían ganado ovino, porcino, caprino y bovino; también se dedican a la crianza de aves de corral y más recientemente se ha implementado el cultivo de flores (Montes de Oca 2001).

Los Quechua comercializan: maíz, papa, hortalizas, cebada, quinua, coca, café, frutas, flores; llamas, guanacos, alpacas, ovejas, cerdos, cabras, vacas; estaño, plata, oro, bismuto y otros minerales; flores, frutas, pollos.

Históricamente, podemos decir que la población Quechua apareció como consecuencia del colapso de la cultura Tiwanacu (Pärssinen y Siiriäinen, 1997). Los Quechua siempre han estado vinculados a la civilización incaica y a la zona de Cuzco, donde en el siglo XII nació el estado regional Inca.

Los Quechuas se expandieron desde el reinado de Viracocha, octavo Inca, que avanzó hasta el Collao, dicha expansión se consolidó en el reinado de Pachacutec, Inca noveno. Pachacutec fue quien hizo construir en la Isla del Sol palacios para él y sus descendientes y un Templo (Covey 2006).

El Inca Huayna Capac fue el que intentó con diferente éxito, conquistar las zonas más alejadas de su imperio. Llegó hasta lo que hoy es la frontera con la Argentina, donde luchó contra los Chiriguano, una guerra que terminó con el fracaso inca.

Durante el reinado de Huayna Capac, los incas también avanzaron en la conquista y sometimiento del Oriente Boliviano, hacia las llanuras y sabanas del Beni y Mamoré (Gisbert, 1980).

Posteriormente el Inca Tupac Yupanqui encomendó al jefe de los Kallawayas, abrir un camino por las cumbres de Apolobamba, ruta que permitió que las tropas imperiales

alcanzasen los llanos del Beni, donde construyeron dos fortalezas. Sobre estas estribaciones de la cordillera el Inca, instaló mitimaes (agrupaciones de familias incas reasentadas de sus comunidades originales para practicar el control y comercio en regiones lejanas del reino Inca) para cultivar maíz y coca, explotar minas auríferas y vigilar las fortalezas edificadas en las últimas cumbres (Capriles y Revilla, 2006).

El Imperio Inca abarcó una superficie de casi 2 millones de Km², el más extenso de cualquier estado de la América Precolombina, entre el océano Pacífico y la selva amazónica que se denominó Tawantinsuyu. Esta macro región estaba dividida en 4 territorios o suyus llamados Chinchaisuyu, Antisuyu, Collasuyu y Contisuyu; con centro geográfico en Cuzco, la capital del Imperio.

El Chinchaisuyu estaba ubicado en el cuadrante noroeste respecto Cuzco y era la región principal del Imperio. El Antisuyu se hallaba en el área de la ceja andina y era una región de intercambio con la zona amazónica. El Contisuyu estaba cerca de Arequipa en la actual Chile y era la región más pequeña. El Collasuyu se localizaba en el cuadrante sureste respecto de la capital, Cuzco y ocupaba la zona altiplánica.

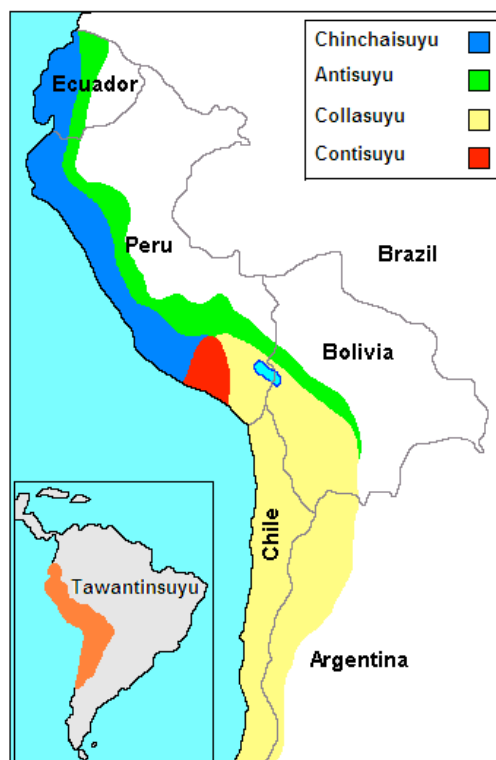


Fig. 66 Distribución geográfica de las regiones incas o Tawantinsuyu.

En el año 1526, los españoles organizaron una expedición organizada desde Panamá por Pizarro, quién hizo un trato económico con Almagro y el Padre Hernando Luque con la finalidad de conquistar el imperio Inca, después de tres años salió la expedición al mando de Pizarro, los españoles se dirigieron a Cajamarca, donde se encontraba el Inca Atahualpa; y después de tomarlo preso fue asesinado.

Después del reinado del Inca Manco II (hermano de Atahualpa), los españoles se asentaron en el Cuzco y en 1534, organizaron la capital del Incanato con regidores y alcaldes.

Los españoles reconocieron a las antiguas autoridades quechuas, para apaciguar a la población y permitieron que se les rindiera homenaje; al igual que a los españoles, les concedieron encomiendas de tierras y minas.

4.1.9 La etnia Aymará

La población Aymará está constituida por 1.243728 habitantes según el censo del 2001, dicha población vive en la ecoregión Andina, en los Departamentos de La Paz, Oruro y Potosí. La lengua Aymará pertenece al grupo de lenguas andinas (Ruhlen 2001)

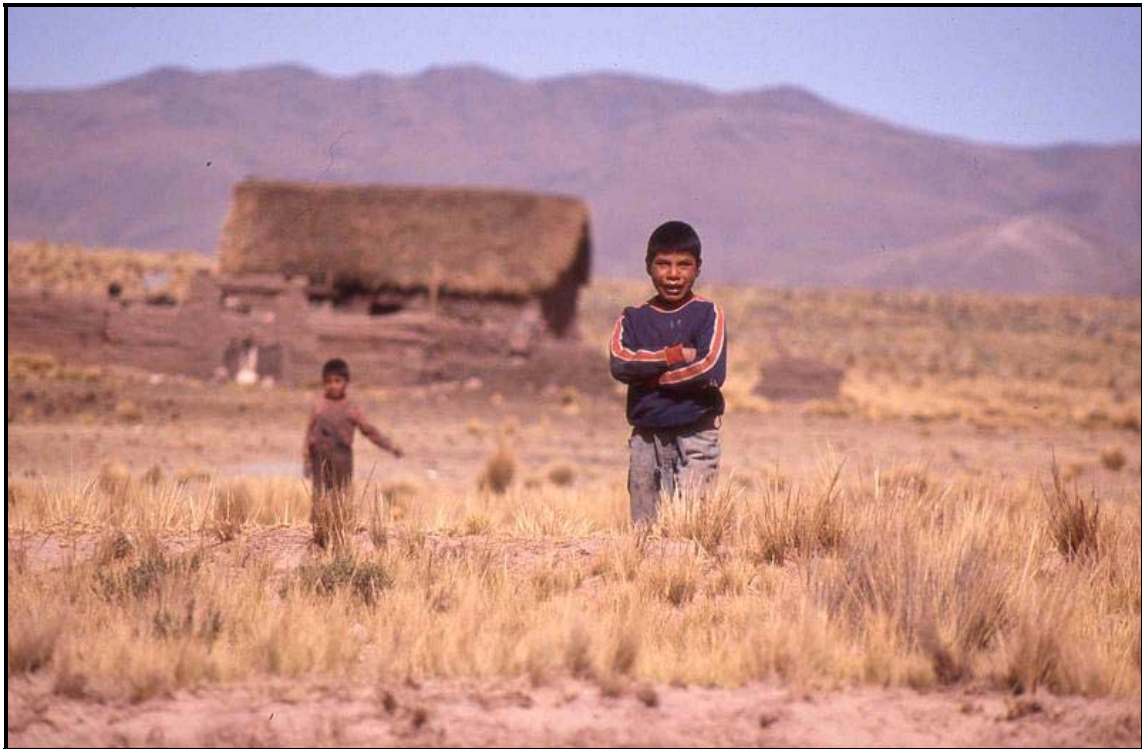


Fig. 67 Niños Aymaras en el altiplano boliviano. Fot. Francesc Bert

Las actividades económicas principales son la agricultura; cultivan patatas, chuños, hortalizas y frutas, también se dedican a la ganadería, la pesca de trucha y pejerrey, otras actividades son las ligadas a la actividad minera y comercial.

El pueblo originario aymará se caracteriza por tener una organización social basada en la descendencia patrilineal, que se plasma en la conformación del ayllu, vocablo que tiene un carácter masculino pues hace alusión a los testes. El acceso a variados climas, se hace posible desde la dispersión de miembros de un mismo ayllu en diferentes pisos ecológicos; siendo la cosmovisión andina la que segmenta al ayllu en dos parcialidades: el urqusuyu, en la parte seca y más ganadera y el umasuyu en la parte más húmeda y agrícola (Van den Berg, Schiffers 2006). La religión Aymará, está íntimamente relacionada con la actividad agrícola, ya que mediante rituales agrarios se consiguen favores de la Pachamama. Los Aymará tienen su propia concepción del tiempo y del espacio, los que están representados en tres mundos:

El Akapacha (nuestro mundo) el mundo de los humanos, donde se desenvuelven los seres vivos, todo lo que nos rodea y puede ser palpable, el suelo, los sembradíos, etc.

El Alaxpacha (mundo de arriba), es el lugar donde habitan Dios y sus santos; el Sol, la luna y las estrellas, lo denominan también el mundo de la Gloria.

Los Aymará se dirigen al Alaxpacha, para pedir al Sol y todas las estrellas, al sol lo identifican con el Dios Cristiano, cuyos rayos dorados rodean la custodia sobre el altar de las iglesias católicas, es un Dios que sabe todo y ordena todo.

El Manqhapacha (mundo de bajo), es el que se encuentra habitado por fuerzas del bien y del mal, los pobladores del mundo de abajo son los muertos, que aún pueden incidir en la vida de los vivos. Por lo tanto, al existir una relación con ambos mundos, los Aymará tratan de estar bien con el mundo de arriba y el de abajo, para lo cual utiliza las ofrendas, que generalmente van dirigidas a la Pachamama y lo que ella representa (fecundidad).

Para poder hacer alusión a las actividades económicas practicadas por el pueblo Aymará, se debe tener en cuenta el contexto ecológico en que sus comunidades se desenvuelven; las características medioambientales permiten el desarrollo de una agricultura de subsistencia que intenta el control vertical de un máximo de pisos ecológicos; por tanto, la dependencia que el Aymara tiene hacia la tierra se observa en la categorización que hacen de sus terrenos en relación con uso que le dan (Murra, 2002).

- Puna: La puna se encuentra por encima de los 4.000 metros sobre el nivel del mar, es una zona montañosa, donde la actividad principal es la ganadería de camélidos (alpacas y llamas) y la minería.
- Altiplano: En este piso ecológico, las actividades principales son la agricultura y la ganadería. La agricultura, producen sobre todo tubérculos como la papa con su inmensa variedad, oca, y cereales como la quinua, kanawa y cebada. La actividad ganadera especialmente de ganado ovino y vacuno, les brinda ingresos monetarios mayores a los de la agricultura, la cual es generalmente de subsistencia. Las comunidades Aymaras de los alrededores del lago se dedican a la pesca y como actividad complementaria a la agricultura.
- Valles Templados: En los valles, la agricultura es la actividad principal, producen: papa, tarwi. En valles intermedios, producen maíz y frutas variedades.
- Yungas: Los Aymará colonizadores, que habitan los Yungas y el Chapare, tienen como actividades económicas, la agricultura, cultivan coca, café, cítricos, plátanos y otras frutas propias de tierras cálidas, la avicultura, minería, caficultura y floricultura.

Los Aymará, que viven en las ciudades en su mayoría se dedican al comercio, venta de fuerza de trabajo, profesionales liberales y a la artesanía.

Los Aymaras se organizan de forma comunitaria en el trabajo en lo que ellos denominan *ethos*, donde resaltan Instituciones de Reciprocidad y Trabajo Colectivo.

La comunidad está conformada por familias que trabajan y producen individualmente y que en algún momento necesitan ayudarse mutuamente, constituyen estos momentos en el ciclo agrícola o en celebraciones comunales. Para tal efecto recurren a las instituciones de reciprocidad que la comunidad ha creado a lo largo de su historia.

Desde un punto de vista histórico los Aymará surgieron, al desaparecer el Imperio de Tiwanacota, cuando se estructuraron nuevas formas de agrupación de las antiguas culturas en torno al Lago Titicaca y nacieron los señoríos Collas, Lupacas y Pacajes.

El Imperio Colla o Aymará se encontraba conformado por varios pueblos, los mismos que habitaban alrededor del Lago Titicaca, cuando el imperio Colla llegó a su esplendor, sojuzgaron a todos los pueblos del Altiplano como a los Charcas, Urus, Tapacarí y Carangas, asimilándolos a su estructura económica, política, social, cultural, religiosa e imponiéndoles su idioma. (Meyers, 2002)

El imperio comprendía los actuales departamentos de La Paz, Cochabamba, parte de Oruro en Bolivia; Puno y Arequipa en Perú.

La historia de los Aymará ha sido caracterizada por cambiantes presiones de los grupos dominantes. Antes de la conquista por los Incas en 1430, los Aymará fueron divididos en varios estados independientes que fueron concentrados en el altiplano, conocidos hoy como las repúblicas de Perú y Bolivia. Aunque no se conoce con precisión cuál es el estado más antiguo de los Aymaras, la civilización Tiahuanaco (2000 AC), usualmente es referida como el primer estado Aymará.

Existían en esta cultura doce reinos separados, que fueron colectivamente referidos como los Collas. Aprovechando estas divisiones, los Incas ingresaron al norte del altiplano y extendieron su reino sobre el territorio Aymará aproximadamente en el siglo XV.

Su incorporación al imperio Inca resultó en un significativo grado de aculturización que se inició antes de la conquista española la cual empezó en 1535. Más adelante se suscitaron cambios en la cultura Aymará que tuvieron lugar durante el periodo colonial.

Carlos V, rey de España, dividió el territorio donde vivían los Aymará, ahora asimilados en la cultura incaica en dos, el norte para Francisco Pizarro, denominado Nueva Castilla y el sur para Almagro con el nombre de Nueva Toledo. Entre los años 1535 y 1536, Aymaras y Quechuas pelearon contra los españoles, al mando de Manco Inca y organizados de acuerdo a los cuatro suyos, sitiaron la ciudad del Cuzco sin haberla podido ocupar por la llegada de refuerzos españoles y también porque era tiempo de cosecha, obligaron a Manco Inca a disolver su ejército, después los españoles persiguieron a todos los incas y sus familiares para eliminarlos (Van den Berg, Schiffers 2006). Entre los años 1540 y 1560, los Aymará participaron de una acción de resistencia, política-religiosa, en las ciudades más importantes, (Albó, 1988) Aymaras y Quechuas decidieron atacar el trabajo religioso de los misioneros y boicotear los obrajes y repartimientos, instaban al rechazo de todos los símbolos no andinos, buscaban la reconstrucción de sus templos destruidos, construyendo depósitos de víveres y armas.

La represión y asesinatos de los sacerdotes andinos apagaron el movimiento restaurador. Tales sublevaciones fueron repitiéndose a lo largo de años hasta que poco a poco la asimilación de las poblaciones andinas a la cultura occidental fue económica políticamente definitiva.

4.2 Los Datos Genéticos

Artículo 1: Gene, M., M. Fuentes, E. Huguet, E. Pique, F. Bert, A. Corella, A. Pérez-Pérez, J. Corbella & P. Moreno. 1998. Quechua Amerindian population characterized by HLA-DQA1, YNZ22, 3' APO B, HUMTH01 and HUMVWA31A polymorphisms. *J. Forensic Sci.* **43**(2):403-405

El análisis del polimorfismo DQ α dio como resultado la presencia de 7 genotipos producto de 6 alelos distintos, los alelos 3 y 4 fueron los más frecuentes representando un 96,8 % del total, el polimorfismo YNZ22 presentó 8 genotipos distintos, representados por 6 alelos, el alelo 4 presentó una frecuencia del 80 % . En el locus 3' APOB se hallaron 20 alelos distintos correspondientes a 8 alelos, la suma de las frecuencias de los alelos 37, 39 y 49 fue del 75,4 % del total.

El sistema HUMTH01 presentó 6 genotipos producto de 3 alelos, la frecuencia más alta correspondió al alelo 7 (61 %). El locus HUMVWA31A presentó 12 genotipos con un total de 5 alelos distintos, los alelos 16, 17 y 18 representaron el 90,9 % del total de las frecuencias génicas.

Los cuatro polimorfismos se hallaron en equilibrio Hardy-Weinberg y el análisis del test de intercorrelación demostró que no había evidencias de correlación entre los alelos para cada comparación entre pares de alelos entre los 5 loci.

Las frecuencias halladas difieren claramente de las frecuencias de poblaciones caucasoides. Las muestras Amerindias sólo fueron comparadas para los sistemas HUMTH01 y 3' APO B, en el caso de HUMTH01 las muestras de la población Quechua difirieron significativamente de las de la población Eskimo y nativa de México, también difieren para 3' APO B para las poblaciones Dogrib y Pehuenche.

Las frecuencias observadas y los valores de utilidad forense “*a priori*” de PD (poder de discriminación) y CE (*Chance exclusion*) para los cinco sistemas fueron inferiores de los descritos para poblaciones europeas de manera que la aplicación en medicina legal de estos marcadores no parece de gran utilidad para la población Quechua.

Artículo 2: Gene, M., P. Moreno, N. Borrego, E. Pique, A. Xifro, M. Fuentes, F. Bert, A. Corella, A. Pérez-Pérez, D. Turbón, J. Corbella & E. Huguet. 2000. Population study of Aymara Amerindians for the PCR-DNA polymorphisms HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQA1. *Int. J. Legal Med.* **113**: 126-128. *Sci.* 43(2): 403-405

La distribución de genotipos para todos los loci estudiados en la población Aymará se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg. Cuando se comparó los polimorfismos HUMTH01, HUMVWA31A, YNZ22 y HLA-DQ α con la población Quechua no se obtuvieron diferencias significativas para los polimorfismos HUMTH01 ($P = 0,7755$), YNZ22 ($P = 0,1508$) y HLA-DQ α ($P = 0,7699$) pero si las hubo para el sistema HUMVWA31A ($P = 5,017 E-04$), para confirmar los resultados de este locus las muestras se tiparon dos veces.

Los resultados concluyeron la existencia de un cierto grado de afinidad genética entre Quechuas y Aymaras excepto para el sistema HUMVWA31A. Con propósitos estrictamente forenses, se calcularon diferentes parámetros de medicina legal a partir de las frecuencias obtenidas.

Artículo 3: Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A and Turbón D, (2001) Major Mitochondrial DNA Haplotype Heterogeneity in Highland and Lowland Amerindian Populations from Bolivia. *Hum Biol.* **73**:1-16

El estudio de los haplogrupos del ADNmt de las poblaciones Aymará, Quechua, Chimane y Masetén del Departamento del Beni (Bolivia) concluyeron que en la región no sólo existe una gran variabilidad lingüística sino también genética, Dichas poblaciones viven actualmente en áreas vecinas que, a veces, se solapan, ocupando ambientes distintos. La multiétnicidad de la zona, de la cual Aymarás, Quechuas, Chimanos y Masetenes son un buen ejemplo se pone de manifiesto por los valores de diversidad genética (h , Nei 1987) que son similares a los hallados cuando se comparan las poblaciones Amerindias del conjunto de Sudamérica. No se hallaron haplotipos combinados (más de un haplogrupo por individuo) y sólo un 2,6% de un total de 233 muestras no pertenecieron a alguna de los principales haplogrupos de las poblaciones nativas de América, dichos individuos (eliminados del análisis genético posterior) deben ser el resultado de procesos de mestizaje con poblaciones de origen caucásico.

Los haplogrupos más comunes en las cuatro poblaciones estudiadas fueron los haplogrupos A y B.

La frecuencia del haplogrupo B en la población Aymará fue muy alto, este hecho fue previamente observado en otros estudios (Merriwether et al. 1995) en el caso de la población Quechua, ésta presentó una frecuencia elevada del haplogrupo B pero los haplogrupos A y C también estaban presentes, este hecho no se había constatado en otros estudios similares realizados con otras poblaciones Quechua (Merriwether et al. 1995).

Los valores más bajos de diversidad genética, utilizando el índice de Nei fueron los hallados en la población Aymará ($h = 0,119$) mientras que los Mosestén alcanzaron valores mucho mas altos ($h = 0,514$).

El análisis AMOVA que es útil para el análisis genético cuando interactúan factores geográficos, lingüísticos e históricos nos situó en un contexto donde los factores geográficos tienen poca importancia comparados con factores culturales como la lengua y la historia reciente de estas poblaciones, de esta manera el análisis AMOVA entre las poblaciones estudiadas indicó una mayor afinidad entre las poblaciones de habla andina (Aymará y Quechua) y entre las poblaciones de habla Pano (Chimane y Mosestén), así mismo el valor de la $\hat{\theta}$ de Weir indicó que los criterios que separan mejor las agrupaciones de poblaciones o clusters son los criterios obtenidos a partir de la distancia de los árboles UPGMA y los criterios histórico-lingüísticos. Los criterios geográficos parece que tengan un peso menor a la hora de agrupar las poblaciones.

La población Aymará parece el grupo mas aislado genéticamente si se compara con las otras poblaciones.

Las similitudes genéticas entre Aymará y Quechua deben ser el resultado de un flujo genético que ha tendido lugar durante milenios en la región andina, de todas formas en el presente estudio existe una cierta influencia de la poblaciones Pano Chimane y Mosestén en el grupo Quechua lo cual indicaría un contacto entre la población Quechua pre-amazónica con las de habla Pano.

Artículo 4: Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A y D Turbón, (2004) Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracaré Amerindian populations from Bolivia lowlands *Ann Hum Biol.* 31 (1): 9-28

La región hipervariable del ADNmt de 54 muestras mostró un total de 34 linajes distintos definidos por 41 posiciones nucleotídicas variables, el 70,6 % de los linajes fueron secuencias únicas. Se encontraron los 4 haplogrupos característicos de las poblaciones amerindias, 18,5% A; 24,1% B; 50,0% C y 5,6% D.

Se hallaron unos niveles altos de variabilidad molecular y sobre la base de los *median networks* se dedujo que el Beni pudo actuar como un núcleo geográfico de expansión poblacional, tal y como los datos históricos apuntan.

El análisis molecular de la varianza (AMOVA) mostró la mayor parte de la varianza es debida a la variabilidad intrapoblacional y que los valores más altos de este parámetro se hallaron cuando se realizaban clusters basados con criterios de afinidad lingüística.

Los árboles filogenéticos presentaban linajes exclusivos vinculados a las poblaciones del Beni.

Artículo 5: Corella A., Bert F., Pérez-Pérez A., Gené M. y Turbón D., (2007) Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian Populations living in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Mosestén, Aymara and Quechua. *Ann Hum Biol.* 34(1): 34-55

En el estudio se observaron 37 posiciones nucleotídicas variables así como un 66,7 % de linajes constituidos por secuencias únicas. El 19,6 % de las secuencias pertenecieron al haplogrupo A, 69,5 % al haplogrupo B, tan solo una secuencia pertenece al haplogrupo C y tres al haplogrupo D. Una secuencia (Chimane 150) no perteneció a ninguno de los cuatro linajes mitocondriales y se ha clasificado como "otros".

El análisis mediante "*median-networks*" mostró las relaciones entre las secuencias. La mayor parte de éstas quedaron agrupadas por haplogrupos y se hallaron haplotipos idénticos en secuencias del presente estudio con poblaciones del Centro y Sur América, la población Quechua se hallaba en la mayoría de los nodos del gráfico. El gráfico siguió una morfología radial indicativa de una expansión poblacional (Forster et al. 1996).

La *mismatch distribution* del conjunto de poblaciones mostró un patrón bimodal con un máximo principal para una diferencia y otro máximo secundario para siete diferencias, la media de diferencias *pairwise* fue de $4,66 \pm 0,97$.

Los parámetros de diversidad genética se han aplicado para todas las poblaciones utilizando el fragmento de ADNmt corto de 328 pb. El valor más bajo de diversidad nucleotídica fue de 0,0065 en la población Aymará y el valor más alto fue 0,0243 hallado en la población Trinitaria y 0,0240 en la población Mosetén. Los resultados fueron similares cuando se utilizó el índice de *mean pairwise differences*. Cuando se aplicó el índice de diversidad génica los valores más bajos se hallaron en poblaciones de Centro América, los Kuna con valores de 0,59 mientras que los Quechua de la región de Arequipa de los Andes obtuvieron los valores de 0,98, en la región andina del Beni los grupos andinos mostraron valores más bajos.

Para comparar las poblaciones del Piedemonte andino con otras poblaciones representativas de Central y Sur América, se analizaron 346 secuencias, Mapuche (Ginther et al. 1993), Zoro, Gavaio y Xavante (Ward et al. 1996), Ngobe (Kolman et al. 1995), Huetar (Santos et al. 1994) Quechua de Arequipa, Tayacaja, Quechua-Nmatsinguenga (Fuselli et al. 2003), Ancash (Lewis et al. 2004) Yanomama (Torroni et al. 1993) y Taino (Lalueza et al. 2001)

La tabla IV (ver artículo) muestra los valores de la matriz de distancia genética usando la distancia genética de Tamura y Nei (1993), a partir de los valores de la distancia genética se generó un árbol *neighbour-joining* (Figura 4 del artículo) donde se observan tres clusters.

El análisis de componentes principales presente en la tabla VI, mostró la distribución de los cuatro haplogrupos en el conjunto de poblaciones estudiadas, el primer componente es el responsable del 45,3 % de la varianza y su distribución está correlacionada con la frecuencia de la suma de los haplogrupos A y B *versus* la suma de los haplogrupos C y D. La segunda componente principal es responsable del 28,6 % de la varianza y discrimina respectivamente el haplogrupo A del B y el haplogrupo C del D.

Las poblaciones están gráficamente distribuidas en el análisis de componentes principales (PCA) en tres grupos geográficos: el primero, constituido por poblaciones de Centro América, presenta frecuencias elevadas del haplogrupo A, el segundo grupo formado por poblaciones del norte y el centro de la región andina con una frecuencia alta del haplogrupo B y el tercer grupo constituido por poblaciones del Sur andino y la Amazonia con

frecuencias elevadas del haplogrupo C y D. Existen algunas excepciones a esta distribución como es el caso de los Boruca de Centro América, los Xavante y Kraho de Brasil y los Ache de Paraguay que se ubican en el grupo central andino y los Piaroa y Cayapa, poblaciones amazónicas que quedan fuera del clúster amazónico.

Las poblaciones del Piedemonte del Beni quedan en el grupo Norte-Central Andino, las poblaciones Aymará y Quechua del Beni pertenecen mayoritariamente al haplogrupo B y quedan cercanos en el cluster, otras poblaciones Aymará y Quechua de otras regiones muestran valores altos de variabilidad intragrupal hecho que hace que su distribución en el clúster sea más amplia, las poblaciones Chimane y Mositén quedan también en el mismo clúster pero más alejados. La afinidad de las poblaciones del Piedemonte del Beni con el grupo central andino se observa también cuando se aplica el análisis AMOVA indicando que el criterio lingüístico es el que mejor explica la agrupación.

La mayoría de autores han señalado la existencia de dos áreas de discontinuidad genética en Sudamérica, la zona andina y la zona amazónica. La primera está caracterizada por la cordillera andina y las serranías pre-andinas que debieron ser colonizadas siguiendo la línea de costa del pacífico así como el corredor del altiplano como una vía natural hace aproximadamente 12 000 años. La segunda zona incluye toda la cuenca amazónica que se debió colonizar desde la costa atlántica utilizando los cursos fluviales para llegar a los distintos ecosistemas amazónicos. Las zonas más australes del continente, se poblaron a partir de la costa tanto atlántica como pacífica a partir de pequeños grupos de cazadores recolectores en diferentes olas migratorias. Las poblaciones que actualmente viven en esta región presentan afinidad genética con las poblaciones amazónicas.

El Piedemonte es una región de transición entre las zonas mencionadas y la caracterización genética de las poblaciones que allí viven es todavía incompleta para revelar el papel de ésta región en el poblamiento de Sudamérica. El estudio del artículo intenta dilucidar si las poblaciones del Piedemonte presentan una mayor similitud con las andinas o con las amazónicas o bien si son un grupo con características propias distinto de sus vecinos.

Desde un punto de vista ecológico el ecosistema predominante del Piedemonte es el de bosque tropical con pequeñas zonas sub-tropicales, existe pues una mayor influencia de los ambientes amazónicos. Los patrones de asentamiento son también similares a los de poblaciones típicamente amazónicas formados por pequeñas poblaciones dispersas. Los resultados obtenidos en PCA, AMOVA y distancias genéticas revelan que las poblaciones que viven en el Piedemonte muestran una mayor similitud con el pool de poblaciones del

centro y del norte de los Andes que con las del sur de los Andes o las de la Amazonía. Estos resultados son los que cabría esperar de las poblaciones Aymará y Quechua que mayoritariamente han vivido en la región andina pero no para las poblaciones Chimane y Mosestén que presentan características más propias de la zona amazónica. Los árboles filogenéticos derivados de las distancias genéticas tienden a agrupar las poblaciones por proximidad geográfica y afinidad lingüística, las poblaciones del Piedemonte se agrupan evidenciando un grado de flujo génico entre ellas, el hecho que la población Quechua del Piedemonte beniano muestre una mayor afinidad genética con la población Aymará del Beni que con otras poblaciones Quechua puede deberse a peculiaridades histórico-geográficas de estas poblaciones. En la región norte y central de los Andes, donde se desarrollaron sociedades complejas durante siglos hubo un aumento de la densidad poblacional (Stanish 2001) que permitió un mayor flujo génico en la región. La vasta zona andina debió funcionar como un territorio de homogenización genética comparado con otros hábitats de Sudamérica. No está claro si la existencia de sociedades complejas y altamente jerarquizadas operaban como una barrera genética que evitase el flujo génico en poblaciones que, no olvidemos, ocuparon un mismo territorio y que tenían sistemas económicos y culturales muy parecidos durante siglos.

Al borde la zona andina, el Piedemonte, valles de Ecuador, Perú y Bolivia los grupos más periféricos de población Quechua experimentaron en diferente grado una mezcla genética con las poblaciones autóctonas y/o diversos procesos de deriva genética que produjo la diferenciación genética que observamos en la actualidad. Las poblaciones Aymará y Quechua del presente artículo serían un ejemplo de éste último caso.

Los valores obtenidos para algunos parámetros genéticos a partir de las secuencias del ADNmt en las poblaciones estudiadas indican que la diversidad genética en la región es mayor que en otras grandes regiones de Sudamérica, éstos valores altos de diversidad genética pueden indicar que la población del Piedemonte no haya pasado por un “cuello de botella” o lo que es más plausible, la existencia de procesos migratorios recientes que implicaron un mestizaje. Los valores altos de diversidad genética concuerdan con la hipótesis de Salzano y Callegari-Jacques (1988) que el área delimitada por el oeste de Bolivia y el norte del Chaco argentino pudo ser un espacio de convergencia o divergencia genética.

Los resultados obtenidos revelan que el Piedemonte no fue una barrera genética en el proceso de dispersión humana entre la zona andina y amazónica sino más bien un corredor entre estas dos ecoregiones, a pesar de la permeabilidad del área, las poblaciones que

vivieron allí manteniendo de alguna forma su especificidad genética evidenciada por la presencia simultánea de antiguos grupos de habla Tucano, de vestigios de la expansión Arawak que llegaron posteriormente, de poblaciones aisladas que hablan lenguas Pano así como la llegada de poblaciones Aymará y Quechua de la zona andina que migraron a la zona del Piedemonte boliviano.

Artículo 6: Corella A., Bert F., Pérez-Pérez A., Gené M. y Turbón D.

HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms in Amerindian populations living in the Beni Department of Bolivia, (2008), *Ann Hum Biol.* **35** (5): 556- 564

Para el locus HUMTH01 se encontraron 6 alelos diferentes, tres de ellos con 6, 7 y 10 repeticiones presentaban altas frecuencias en la muestra estudiada. Para el alelo HUMVWA31A se encontraron 8 alelos diferentes, pero sólo tres (15, 16 y 17 repeticiones) se hallaron con frecuencias relativamente altas en todas las poblaciones estudiadas. Para HUMCSF1PO se hallaron 6 alelos diferentes, los más frecuentes fueron los de 10, 11 y 12 repeticiones. El locus HUMTPOX presentó 5 alelos totales y los más frecuentes fueron los de 8 y 11 repeticiones.

El análisis de componentes principales realizado con el conjunto de poblaciones Amerindias disponibles incluyendo las del presente estudio Aymará, Quechua y Beni señaló que el primer componente era responsable del 36,2 % de la varianza y discriminaba claramente el conjunto de poblaciones sudamerindias de las poblaciones Dogrib (América del Norte) y Cabecar (América Central). El segundo componente principal explicaba el 23,6% de la varianza observada y relacionaba las poblaciones Aymará, Quechua y Beni con el resto de poblaciones sudamericanas aunque las tres poblaciones estudiadas quedaban estadísticamente más próximas, éste hecho indicaría un cierto grado de flujo génico entre dichas poblaciones, tal y como ya se había observado en los estudios previos utilizando ADNmt (Bert et al. 2001)

Artículo 7: López-Parra AM, Tirado M, Baeza C, Bert, F, Corella A, Pérez-Pérez A, Gamba C, Fernández E, Arroyo-Pardo E. Genetic structure of the population of Beni department (North Bolivia), (2008), *For Sci Int.* **1**: 348-349

Entre los 86 individuos estudiados se hallaron 53 haplotipos diferentes para los 15 loci seleccionados, la diversidad haplotípica fue $0,9778 \pm 0,0076$. Un haplotipo se halló en 10 individuos (13-12-17-24-10-13-13-14-11-12-11-19-22-15-15) para DYS19-DYS389I-DYS389b-DYS390-DYS391-DYS-392-DYS393-DYS437-DYS438-DYS439-GATA H4.1-DYS448-GATA C4-DYS458-DYS456), 9 de estos 10 individuos presentaron el genotipo 14-17 (DYS385a,b). Este haplotipo concuerda una vez con la base de datos de referencia del Cromosoma Y (<http://www.yhrd.org>) y con cinco haplotipos vecinos. Todos estos haplotipos fueron de América Central y Sud-América. La comparación de las muestras del Beni se llevó a cabo utilizando el haplotipo mínimo excepto para DYS385a,b. La menor distancia genética R_{st} entre la población del Beni y otras poblaciones fue con la población de Perú ($R_{st}=0,01875$).

La distancia genética mayor se halló ante las poblaciones Afro-Colombianas. Todas las distancias entre la población del Beni (Bolivia) y las del resto del continente fueron significativas.

La separación genética entre las poblaciones del Perú y Beni (Bolivia) respecto al resto de poblaciones Sudamericanas también se puso de manifiesto en el análisis por parejas R_{st} realizado y presentado en los gráficos MDS y *Neighbour-Joining*.

El análisis SAMOVA dio un valor estadísticamente significativo del 22,89% del total de la variación genética cuando se utilizaron los grupos 1: Beni (Bolivia) / Perú, 2: Afro-Colombianos, 3: Resto de poblaciones.

Artículo 8: Tirado M., López-Parra A.M., Baeza C., Bert F., Corella A., Pérez-Pérez A., Turbón D. y Arroyo-Pardo E. Y-chromosome haplotypes defined by 17 STRs included in AmpFISTR Y filer PCR Amplification Kit in a multi ethnical population from El Beni Department (North Bolivia) (2009) *Leg Med.* **11**(2): 101-103

Se llevó a cabo un análisis *Multidimensional Scaling* (MDS) con las distancias R_{st} utilizando el programa SPSS ver 15.0 (Fig. 1 artículo). Las poblaciones disponibles incluidas en el presente estudio fueron Norte Brasil (BRA_N), Brasil Nordeste (BRA_NE), Brasil

Central Oeste (BRA_CW), Brasil Sudeste (BRA_SE), Brasil Sur (BRA_S), [4] Argentina Córdoba (ARG_CO), [5] Perú (PER), [6] Bolivia Mojeños (BOL_MOX), [7] Bolivia altiplano (BOL_H) y Bolivia Llanos (BOL_L), [8] Bolivia Beni (BOL_BENI). La población del Beni mostró una remarcable diferenciación respecto otras poblaciones más o menos cercanas. En general, las poblaciones de Bolivia mostraron una clara diferenciación si se comparan con el resto de poblaciones de zonas limítrofes, las muestras del Beni fueron las más similares de toda la serie. Los resultados del presente estudio indicaron una diferenciación genética estadísticamente significativa entre las distintas poblaciones de Bolivia. La información genética sugiere que procesos evolutivos tales como deriva genética, selección natural y mezcla genética han modelado la historia demográfica de estos grupos humanos.

Los datos obtenidos pueden compararse en la mayoría de bases de datos sobre el cromosoma Y:

Y-STR Haplotype Reference Databases (www.yhrd.org),

Yfiler database (www.appliedbiosystems.com/yfilerdatabase),

Promega PowerPlex® Y System (www.promega.com/techserv/tools/pplexy/pplexy.asp)

ReliaGene Database (www.reliagene.com)

Artículo 9: Bert F, Corella A, Pérez-Pérez A, Gené M, and Turbón D. Piedmont and Llanos de Moxos Populations living in the Beni Department (Bolivia) characterized by HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms (en preparación)

En el análisis de los diferentes sistemas STRs se observó que el locus HUMTH01 exhibía 6 alelos, dos de ellos, los de 6 y 7 repeticiones con altas frecuencias. El locus HUMVWA31A mostró un total de 8 alelos pero sólo los de 15, 16 y 17 repeticiones fueron relativamente frecuentes.

El locus HUMCSF1PO también presentaba 6 alelos y las repeticiones 10, 11 y 12 fueron las más frecuentes. El locus HUMTPOX presentó 5 alelos y las frecuencias más altas fueron las de 8 y 11 repeticiones.

Los valores de heterocigosidad estaban entre 0,286 y 0,909. Todos los loci estaban en equilibrio Hardy-Weinberg excepto los locos HUMVWA31A y HUMTPOX en la población Masetén y el locus HUMTH01 en la población beniana.

El árbol filogenético UPGMA realizado con las frecuencias de los locus HUMTH01 y HUMCSF1PO de las poblaciones estudiadas y otras poblaciones del resto del mundo mostró la existencia de dos clusters o agrupaciones principales, uno formado exclusivamente por poblaciones amerindias y otro compuesto por el resto de poblaciones del resto de los continentes. La proximidad lingüística y cultural en el caso de las poblaciones de Bolivia parece evidente en el árbol UPGMA.

Los mapas de isofrecuencia de las frecuencias de los haplogrupos A, B, C y D del ADN mitocondrial indican una gran afinidad con las áreas de distribución lingüística en Sudamérica y según cada caso con las posibles expansiones de las poblaciones Chibcha (Haplogrupo A), Andina y Pano (Haplogrupo B), Arawak (Haplogrupo C) y Arawak y Tupí-Guaraní (Haplogrupo D).

Los árboles filogenéticos derivados de las distancias genéticas tendieron a agrupar las distintas poblaciones por proximidad geográfica y/o afinidad lingüística, el caso del cluster de las poblaciones del Piedemonte se puede explicar por flujo génico entre dichas poblaciones y lo mismo se puede deducir de las poblaciones de los Llanos. El caso de la afinidad de Quechuas y Aymaras se podría explicar la gran afinidad cultural y las marcadas estructuras sociales que actuaron durante siglos permitiendo elevados niveles demográficos, con ésta situación demográfica tuvo que existir un elevado flujo génico en todo el territorio que tendería a homogenizar genéticamente a las poblaciones en comparación a otras ecoregiones de Sud América. (Stanish 2001)

4.3 Discusión general

El poblamiento humano de América del norte esta bastante bien establecido, el modelo mas parsimonioso propone una única migración de unos pocos individuos hace unos 25 000 -15 000 años a lo largo de la costa del Pacífico (Bonatto and Salzano 1997; Hey 2005; Merriwether et al. 1995; Silva et al. 2002; Stone and Stoneking 1998) y una nueva migración de menor impacto que penetra por el corredor libre de hielo que se hallaba entre Laurentia y la placa glacial de las montañas Rocosas hace unos 12 500 años (Schurr and Sherry, 2004).



Fig. 68 Representación del corredor que permitió la segunda ola migratorio en América hace unos 12,500 años.

Por otro lado, la llegada del hombre al continente sudamericano y la dispersión de sus poblaciones, ha sido un proceso mucho más complejo y que han generado diversos debates entre la comunidad científica.

En Sudamérica, aunque existen multitud de yacimientos arqueológicos y datos genéticos que sugieren un poblamiento hace unos 14 000 años (Dillehay 1999; Dixon 2001; Fuselli et al. 2003), todavía no existe unanimidad a la hora de establecer las rutas y el número de migraciones iniciales (Lalueza et al. 1997; Luiselli et al. 2000; Moraga et al. 2000; Rothhammer et al. 2001; Tarazona-Santos et al. 2001). Se han propuesto diversas vías de entrada al subcontinente:

- Costa del Pacífico y Mar del Caribe.
- Zonas boscosas del Piedemonte andino.
- Altiplano de los Andes.
- Zonas áridas y sabanas entre los Andes y la costa Atlántica.

En Sudamérica, los corredores migratorios grandes diferencias en su orientación. La zona oeste de Sudamérica, la zona andina, hace unos 13 000 años se caracteriza por ser una ecoregión extremadamente estrecha, con un corredor altiplánico igualmente estrecho, la orientación norte-sur de dicho corredor debió forzar a las poblaciones que allí habitaban a

moverse en esta única dirección si no querían cambiar de ecoregión. Por otro lado, los movimientos migratorios norte-sur utilizando el Piedemonte debieron ser más complejos por la presencia de valles más o menos abruptos que dificultaban los desplazamientos humanos.

Al Este de los Andes, en la región amazónica la diversidad de ambientes y ecoregiones es claramente mayor que en la región andina y los corredores migratorios podían ser radiales aunque seguramente el curso de los ríos marcó el sentido de dichas migraciones.

La máxima disimilaridad entre las ecoregiones andinas y amazónicas se halla alrededor de los 15°-30° latitud Sur, en estas latitudes es donde, por lo general el cambio entre las dos regiones se hace más acusado tanto desde un punto de vista orográfico como microclimático en un transecto longitudinal menor.

Las ecozonas en el cono sur del continente son más desérticas y frías al Este de los Andes y por lo tanto las diferencias entre las pampas frías y los Andes australes que a estas latitudes han perdido parcialmente su altitud, son menores.

La dispersión humana en Sudamérica puede caracterizarse por:

- Velocidades de dispersión distintas según el corredor utilizado (mayor en los Andes que en el Amazonas)
- Necesidades adaptativas distintas según la ecoregión dominante del corredor utilizado.
- Contingencias paleodemográficas, “*bootlenecks*”, adaptaciones, efectos fundador y de deriva génica.
- Reorganización de los ecosistemas a lo largo del tiempo resultantes de fenómenos climáticos.

La mayor parte de la comunidad científica considera que existen dos áreas principales de la discontinuidad genética en el continente: el área andina y la cuenca amazónica. La primera de estas regiones geográficas esta caracterizada por las cadenas montañosas andinas y preandinas y pudo ser colonizada gracias al corredor andino o bien siguiendo la línea de costa pacífica hace alrededor 12 000 años.

La segunda gran área, incluye la región amazónica, colonizada en diversos episodios a partir de la costa atlántica utilizando las vías fluviales para penetrar en los diversos ecosistemas amazónicos.

La región más meridional del continente debió colonizarse desde la costa atlántica y/o pacífica por pequeños grupos de cazadores-recolectores. Las poblaciones indígenas que

habitan hoy en día esta última región parecen tener una mayor afinidad genética con las poblaciones amazónicas.

Al oeste del subcontinente, la zona andina, las poblaciones presentan unos valores altos de diversidad genética intrapoblacional y unos valores bajos de distancia genética si se comparan con las poblaciones del este o amazónicas del subcontinente, (Fuselli et al. 2003; Lewis et al. 2005; Luiselli et al. 2000; Tarazona-Santos et al. 2001).

Este patrón de distribución genético, se pudo originar al inicio del poblamiento de Sudamérica si las poblaciones andinas y las amazónicas se hubieran originado por procesos migratorios distintos, donde, o bien la migración más antigua sería la andina (Tarazona-Santos et al. 2001) o bien el efecto “cuello de botella” hubiera tenido un menor impacto en los grupos andinos que en las poblaciones amazónicas.

Alternativamente, éste fenómeno de dicotomía genética entre el este y el oeste de Sudamérica pudo suceder después de la llegada del hombre a Sudamérica mediante procesos evolutivos donde variables como el tamaño poblacional, el flujo génico y la deriva genética habrían actuado durante los últimos 14 000 años (Fuselli et al. 2003; Lewis et al. 2005; Luiselli et al. 2000; Tarazona-Santos et al. 2001).

Si el modelo de una única migración a través de América central fuera el correcto, la variación genética encontrada entre las poblaciones andinas y amazónicas sería similar, en cambio, si el poblamiento fue a partir de dos migraciones con una base genética diferente, ésta diferencia se tendría que reflejar en las poblaciones antiguas y modernas de las dos regiones.



Fig. 69 Ubicación geográfica del Piedemonte

Los estudios realizados en esta tesis, efectuados en un área de Bolivia con ambientes ecológicos muy distintos pero relativamente próximos entre sí, donde las poblaciones que allí habitan presentan una gran variabilidad lingüística y cultural; apuntan a que la proximidad lingüística y en menor medida la proximidad geográfica son factores determinantes a la hora de establecer afinidades genéticas tanto si se analizan marcadores autosómicos como los STR's como si se observan marcadores del cromosoma Y o del ADN mitocondrial. En este último caso, los valores hallados de diversidad genética hallados utilizando el índice de Nei son equivalentes a los hallados en zonas del continente americano mucho más amplias (Bert et al. 2001). La población con un índice de diversidad más alto fue la Mometén y la que tuvo un valor más bajo, la Aymará.

Las poblaciones Quechua y Aymará no sólo se diferencian significativamente de las poblaciones del norte y centro de América sino que presentan diferencias con poblaciones del cono sur del continente. De las dos poblaciones, la Aymará es la que presenta una menor diversidad haplotípica y nucleotídica de manera que parece ser la población con un pasado de mayor aislamiento de las estudiadas. Así mismo, parece evidente un flujo génico entre las poblaciones de habla Pano, Chimane y Mometén con la población Quechua.

Los haplogrupos del ADN mitocondrial más comunes en la región son los haplogrupos A y B.

Genéticamente podríamos situar la población Quechua en centro de un flujo génico entre las poblaciones Pano (Chimane y Mometén) y la población Aymará ya que comparten algunas secuencias de la HVSI I.

Las secuencias de la región de control del ADN mitocondrial de los individuos de la etnia Quechua, cuando se comparan con otras poblaciones del continente Sudamericano, están presentes en una buena parte de los nodos de los *median networks* que representan las poblaciones sudamerindias.

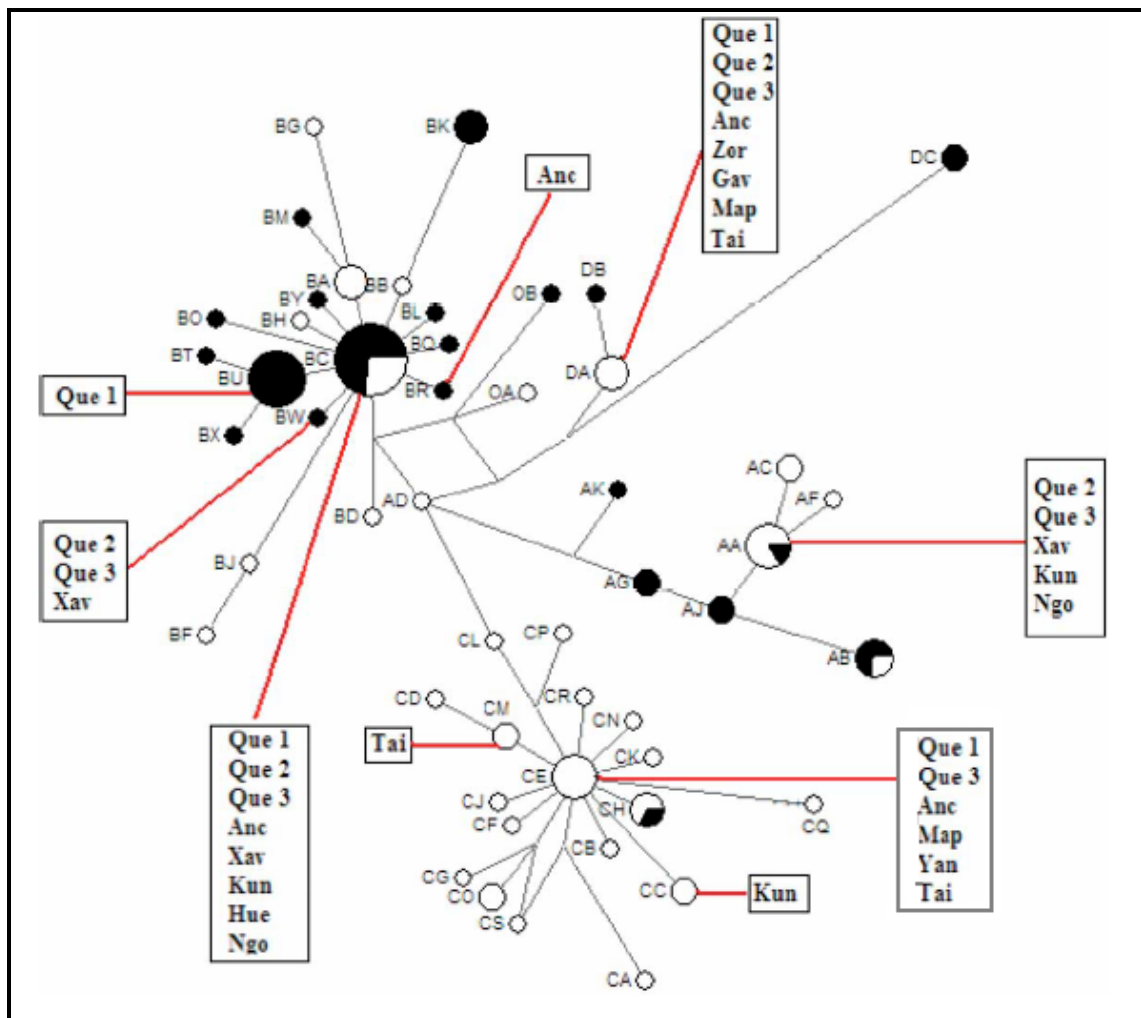


Fig. 70 *Median-joining network* mostrando las 46 secuencias de la región I de control del ADN mitocondrial estudiadas (en negro) y secuencias de otras poblaciones sudamericanas.

Las secuencias correspondientes al haplogrupo B presentan una forma estrellada que indicaría un fenómeno de expansión poblacional reciente (Forster et al. 1996) y/o la ausencia de cuellos de botella en dicha población. Este hecho junto a los valores altos de diversidad

genética indicaría que la zona debió ser en el pasado una zona de convergencia o divergencia poblacional tal y como señalan Salzano y Callegari-Jacques (1988).

Los estudios del AMOVA y de Análisis de componentes principales indican que en América central y Sudamérica existen tres grandes áreas genéticas:

- Centro América
- El Norte y Centro de los Andes
- La región amazónica junto al Sur Andino.

En la primera el haplogrupo del ADNmt mayoritario es el A. En la zona andina norte y central, los haplogrupos mayoritarios son el B y el A, con alguna excepción (Boruca, Xavante, Kraho y Ache) mientras que en el Amazonas y Sur Andino los haplogrupos más comunes son C y D exceptuando las etnias Piaroa y Cayapa.

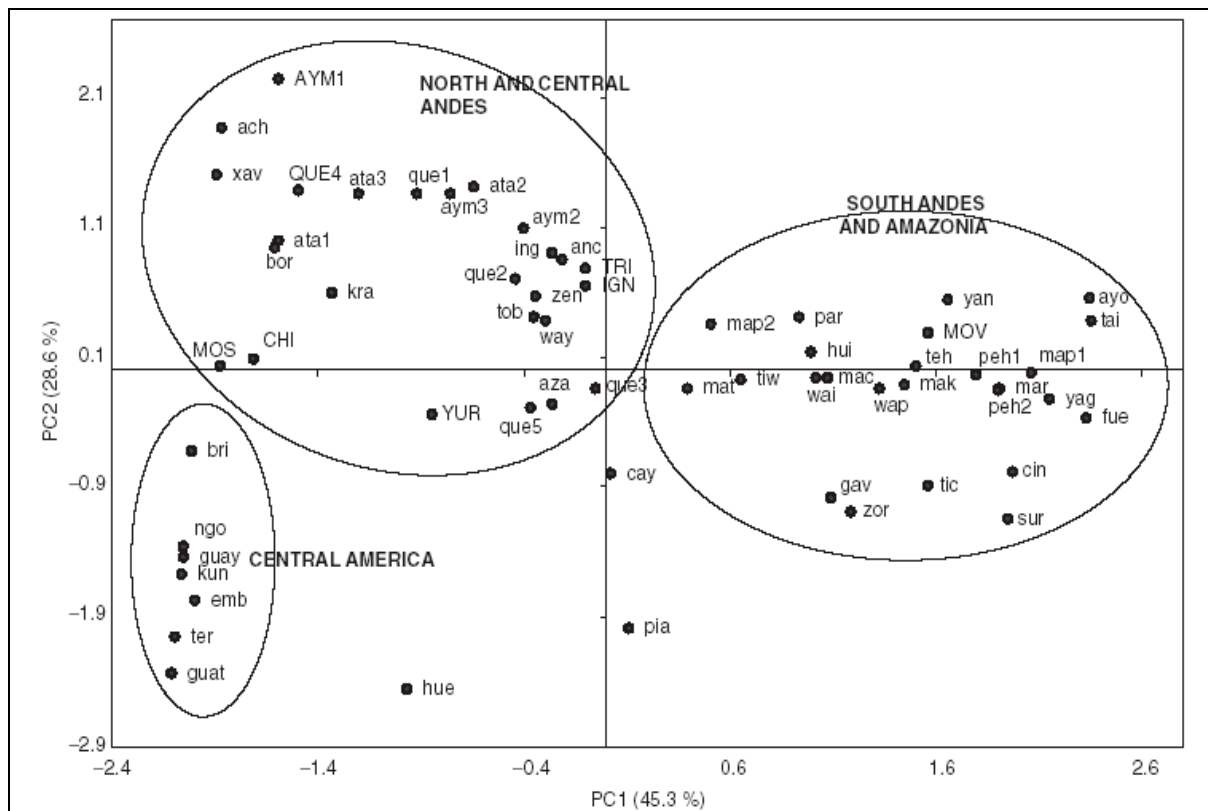


Fig. 71 Análisis de componentes principales donde se analizan las secuencias de la región de control de las poblaciones Aymará, Quechua, Chimane y Mosestén junto a otras poblaciones sudamericanas.

En el caso de las poblaciones de lengua Pano, Chimane y Mositén, si bien sus patrones de asentamiento y dinámicas económicas son típicamente amazónicas genéticamente quedarían englobadas dentro del conjunto de poblaciones de influencia andina (Castillo 1988).

La región del Piedemonte es una zona de transición entre la región andina y la amazónica. La caracterización genética de dichas poblaciones es demasiado incompleta para determinar la relevancia de esta ecoregión en el proceso del poblamiento de Sudamérica.

Desde un punto de vista ecológico, el ecosistema predominante del Piedemonte es el bosque tropical con transición a subtropical, con una influencia mayor de los ambientes amazónicos que de los andinos. Los patrones del establecimiento humano son similares a las poblaciones amazónicas, caracterizados por las agrupaciones dispersas y reducidas de la población. A pesar de estas consideraciones los resultados obtenidos en el PCA, AMOVA y el análisis de las distancias genéticas revelaron que los grupos que habitan el Piedemonte (Aymará, Quechua, Chimane y Mositén) comparten más semejanzas con las poblaciones de los Andes norcentrales que con las poblaciones del sur los Andes y Amazónicas. Esto sería lo que cabría esperar para los grupos Aymará y Quechua, poblaciones que mayoritariamente habitan la región andina y el altiplano aunque su territorio pueda extenderse hasta el Piedemonte, pero no para los Chimane y Mositén con características más asociadas a las poblaciones amazónicas.

Los árboles filogenéticos obtenidos a partir de las distancias genéticas tienden a agrupar las poblaciones Amerindias por proximidad geográfica y afinidad lingüística.

El hecho de que la población Quechua del Beni presente una mayor afinidad genética con la Aymará que otras poblaciones Quechua estudiadas en otros países podía ser debida a algunas particularidades históricas y geográficas de esta población. En la región norte-central de los Andes, donde estructuras sociales complejas se desarrollaron durante siglos alcanzando importantes niveles demográficos (Stanish 2001), pudo haberse producido un elevado flujo génico. La región andina, un territorio extenso, pudo haber funcionado como un espacio genético homogéneo comparado con otros hábitats sudamericanos. No está claro si la existencia de sociedades complejas y diferenciadas funcionó como un obstáculo al flujo génico en poblaciones que compartieron territorios comunes, afinidades culturales y recursos naturales durante milenios.

En la frontera del Zona andina, el Piedemonte y los valles de Ecuador, de Perú y de Bolivia, las poblaciones Quechua periféricas experimentaron, en diferente grado, fenómenos

de mestizaje con poblaciones autóctonas y/o diversos procesos de deriva genética que provocarían la diferenciación genética que se observa hoy en día en el área. Las poblaciones Aymará y Quechua estudiadas podrían ser un ejemplo de este fenómeno.

Los resultados obtenidos revelan que el Piedemonte no fue una barrera para la dispersión de grupos humanos entre los Andes y la Amazonia. La idea más plausible es que el Piedemonte constituyó un corredor entre las dos ecoregiones.

A pesar de la permeabilidad de esta región, las poblaciones que vivieron allí mantuvieron su propia especificidad cultural y genética, en este sentido el Piedemonte beniano estaría constituido por poblaciones que deben ser consideradas diferentes de las andinas y de las amazónicas.

La distribución geográfica de los distintos haplogrupos del ADNmt se ajusta bastante bien a la distribución de las grandes familias lingüísticas Macro-Chibcha-Paezan, Macro-Andina, Macro-Pano, Macro-Caribe, Macro-Ge y Macro-Ecuatorial-Tucanoana. Con una fuerte correlación en el caso de las lenguas Chibcha, Andina y Pano por un lado y las lenguas Gé, Caribe y Ecuatorial por otro.

Este hecho indicaría una correlación entre las variables lingüística y genético materna de manera que se puede deducir que la movilidad femenina ha sido históricamente mucho menor que la masculina en esta región.

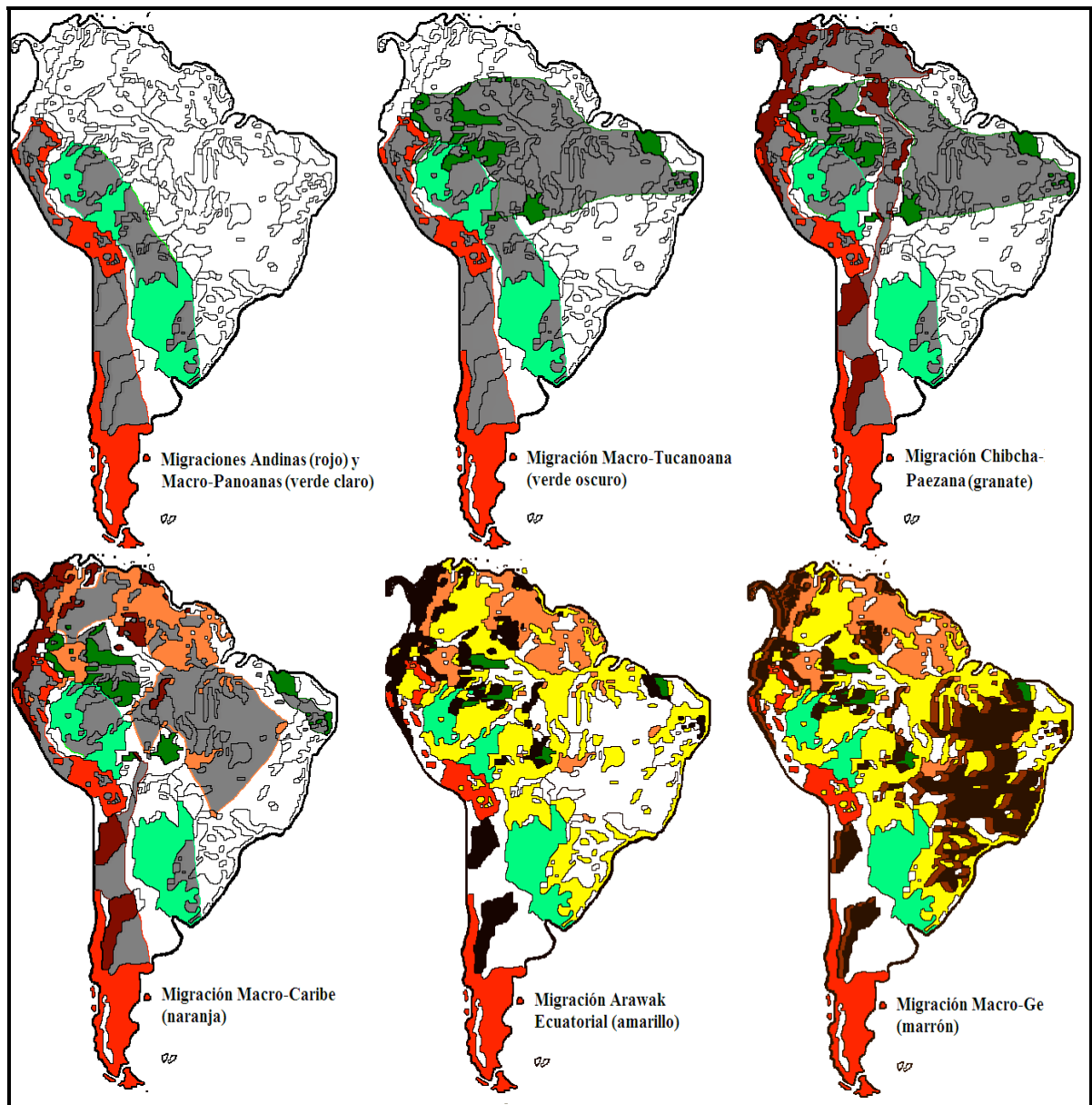


Fig. 72 Distribución geográfica de las principales familias lingüísticas en Sudamérica

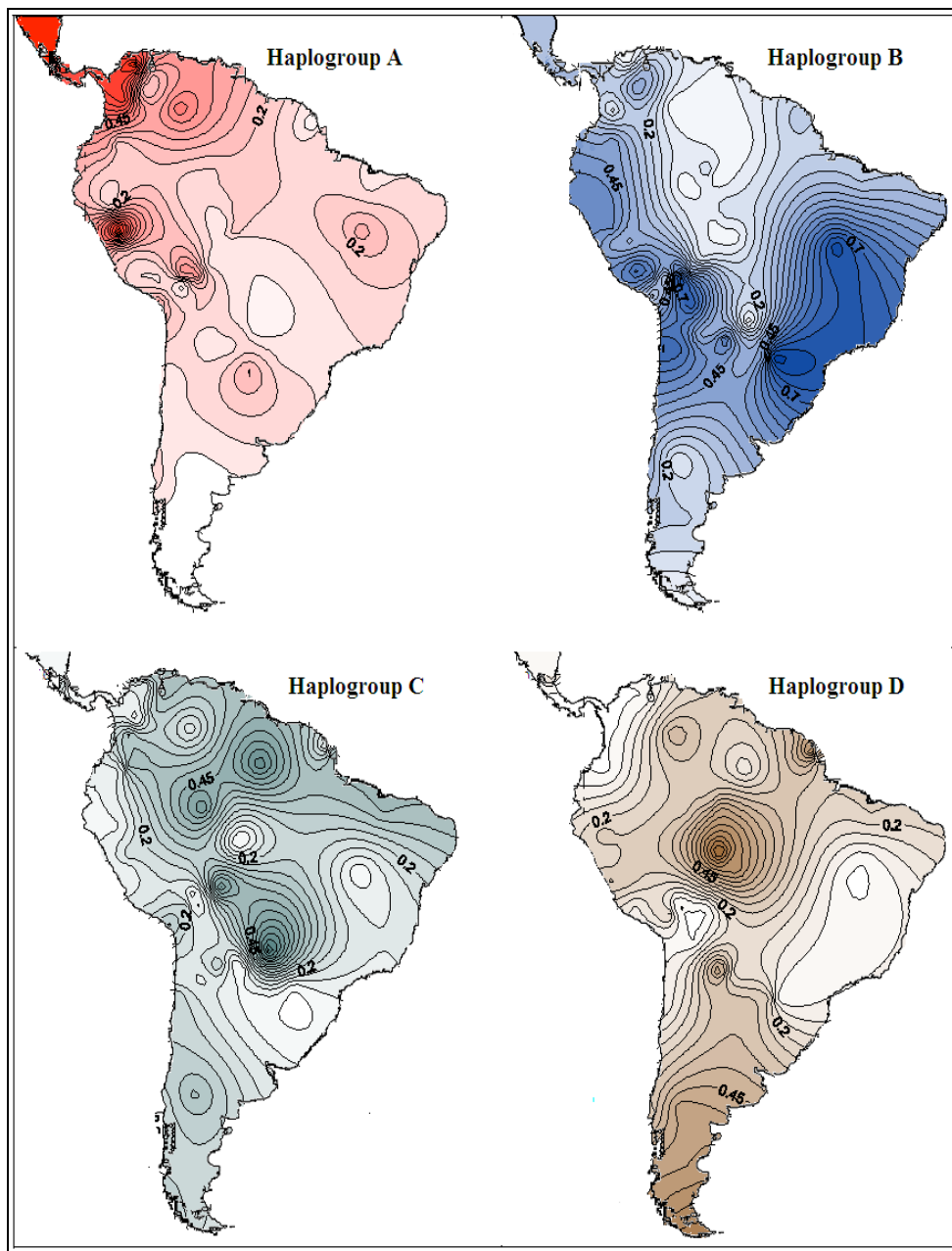


Fig. 73 Distribución geográfica de las isofrecuencias de los distintos haplogrupos de ADN mitocondrial. A Chibcha, Andino, Pano, B Andino, Pano, Gé, C Caribe, Ecuatorial-Tucanoana, Paezán, D Ecuatorial-Tucanoana, Gé, Andino

Si se consideran los datos del análisis del cromosoma Y se observa una gran movilidad de la población masculina proveniente de los Andes. El análisis de componentes principales tiende a agrupar las poblaciones estudiadas con poblaciones del Perú lo que indicaría una migración selectiva de género masculino en la región del Beni. Este hecho estaría explicado no sólo por los diversos intentos de ocupación, colonización o sometimiento del Piedemonte por parte de distintas poblaciones andinas que llevarían a cabo

individuos del sexo masculino, sino también por intensos y constantes procesos de intercambio comercial entre las dos ecoregiones. Estas relaciones aparecen desde entonces como una característica de los Andes centrales y del norte con el Piedemonte, mientras cada región desarrolla los medios de subsistencia y las economías divergen cada vez más, los desplazamientos a lo largo de los ejes transversales se extienden y las relaciones e intercambios en vastas escalas se reafirman empezándose a formar redes de intercambio económico que mayoritariamente realizaban los hombres.

Parece evidente que a diferencia de los haplogrupos del ADNmt que se distribuyen siguiendo las zonas de origen y distribución de los principales troncos lingüísticos de Sudamérica y la distribución del cromosoma Y con una distribución mucho más difusa, no coinciden en el modelo de distribución en el continente.

Por otro lado, la presencia del linaje exclusivo Q-M19 del cromosoma Y en poblaciones de lengua Ecuatorial–Tucanoana como los Ticuna del alto Amazonas y los Wayuu del norte de Colombia que no se ha hallado en otras poblaciones de Sudamérica incluidas algunas del mismo tronco lingüístico y próximas geográficamente, sugiere que dichas poblaciones han pasado por procesos de aislamiento poblacional que debieron ocurrir al principio de la llegada del hombre a Sudamérica ya que el haplotipo Q-M19 es tan antiguo como su haplogrupo parental Q-M3, unos 7 500 años.

Estos datos apuntan a que fenómenos de tribalización se produjeron muy al principio de la colonización de Sudamérica y son consistentes con la idea que las poblaciones pasaron por procesos de deriva genética que contribuyeron al origen y a la fragmentación de las lenguas Sudameríndias.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

5.1 Generales

1. Existe una cierta diferenciación genética entre las poblaciones Andinas, del Piedemonte y de los Llanos sea cuál sea el marcador utilizado. Ésta diferenciación sería generalizable a lo largo de toda la región de contacto andino-amazónica del subcontinente.
2. La región de Piedemonte debe haber actuado como una zona de transición no sólo geográfica y cultural sino también genética. Primariamente, el patrón de diferenciación depende más de factores culturales como la lengua que de factores geográficos.

5.2 Demográficas

1. Los tamaños de las poblaciones Macro-Pano estudiadas son extremadamente bajos y se hallan en una situación de gran vulnerabilidad, algunos de los grupos étnicos están al borde de la extinción. La situación es muy diferente para el caso de las poblaciones Aymará y Quechua que poseen unos tamaños poblacionales altos.
2. El espacio vital de las poblaciones Macro-Pano del Piedemonte se ha ido reduciendo históricamente debido a la presión e intereses económicos de sus tierras y por la llegada creciente de población colona de otras regiones.
3. Las tasas de natalidad de las poblaciones Macro-Pano són altas pero existe una elevada mortalidad infantil debido a la marginalidad y aislamiento de estos grupos y a la exclusión de servicios básicos de salud y educación.

5.3 Poblacionales y filogenéticas

STRs autosómicos

1. El árbol filogenético UPGMA realizado con las frecuencias de los loci HUMTH01 y HUMCSF1PO de las poblaciones estudiadas y otras poblaciones del resto del mundo mostró la existencia de dos *clusters* o agrupaciones principales, uno formado exclusivamente por poblaciones Amerindias y otro compuesto por el resto de poblaciones del resto de los continentes.
2. El análisis de componentes principales realizado con el conjunto de poblaciones Amerindias disponibles, señaló que el primer componente discriminaba claramente el conjunto de poblaciones Sudamerindias de las poblaciones Dogrib (América del Norte) y Cabecar (América Central). El segundo componente principal relacionaba las poblaciones Aymará, Quechua y Beni con el resto de poblaciones Sudamericanas.
3. El estudio de los STRs autosómicos indica que la población Quechua difiere significativamente de otras poblaciones del Norte y Centroamérica para el sistema HUMTH01 y difiere de poblaciones del Norte y del cono Sur del continente para 3'APO B. Entre las poblaciones Quechua y Aymará existe un importante grado de afinidad para todos los sistemas excepto para HUMVWA31A.

Haplogrupos del ADNmt

4. Todas las muestras pertenecientes a la región del Piedemonte andino del Departamento del Beni corresponden a uno de los cuatro principales linajes del ADN mitocondrial, confirmándose el origen nativo americano de dichas poblaciones.
5. El estudio de haplogrupos del ADNmt concluye que los haplogrupos A y B son los más comunes en la región Sub-andina del Piedemonte. La frecuencia del haplogrupo B en la población Aymará es alta, tal y como Merriwether et al. (1995) habían detectado. A su vez ésta población presenta los valores más bajos de diversidad genética cuando se utiliza el índice de Nei ($h = 0,119$).
6. Los árboles filogenéticos derivados de las distancias genéticas agrupan las poblaciones por afinidad lingüística, el caso del *cluster* de las poblaciones del Piedemonte se puede explicar por flujo génico entre dichas poblaciones.
7. Los mapas de isofrecuencia de las frecuencias de los haplogrupos A, B, C y D del ADN mitocondrial indican una gran afinidad de éstos marcadores con las áreas de distribución lingüística en Sudamérica y con las posibles expansiones de las poblaciones de lengua Chibcha (Haplogrupo A), Andina y Pano (Haplogrupo B), Arawak (Haplogrupo C) y Arawak y Tupí-Guaraní (Haplogrupo D).
8. La afinidad entre Quechuas y Aymaras podría explicarse por las marcadas estructuras sociales y hábitos culturales que actuaron durante siglos en el área Andina y que permitieron elevados niveles demográficos. Esta situación demográfica permitiría un flujo génico en todo el territorio que tendería a homogenizar genéticamente a las poblaciones con mayor intensidad que en otras ecorregiones de Sudamérica.

Secuenciación del ADNmt (HVRI)

9. La correspondencia entre los polimorfismos de restricción o haplogrupos y los polimorfismos de secuenciación de la región HVRI del ADNmt en las poblaciones estudiadas es prácticamente absoluta, confirmándose que se trata de métodos eficaces para autenticar resultados genéticos.
10. A partir del análisis de los *median networks* realizados con las secuencias del ADNmt de la región HVRI se deduce que la región del Beni pudo haber actuado como un núcleo geográfico de expansión o concentración demográfico, tal y como indican los datos históricos y lingüísticos.
11. El Análisis de componentes principales (ACP) separa las poblaciones con mayor frecuencia de los haplogrupos A/B de las que presentan mayor frecuencia de los haplogrupos C/D.
12. En el análisis de componentes principales las poblaciones están gráficamente distribuidas en tres grupos geográficos: el primero, constituido por poblaciones de Centro América, presenta frecuencias elevadas del haplogrupo A; el segundo grupo formado por poblaciones del norte y centro de la región andina con una frecuencia alta del haplogrupo B y el tercer grupo, constituido por poblaciones del Sur andino y la Amazonia, presenta frecuencias elevadas del haplogrupo C y D.
13. El análisis AMOVA indica que el factor más determinante para explicar la afinidad genética es el lingüístico, que agrupa las poblaciones de habla Andina (Quechua y Aymará) por un lado y Macro-Pano (Chimane y Mosestén) por otro.
14. Las secuencias de la región de control del ADNmt en poblaciones Chimane y Mosestén presentan una baja diversidad genética y un elevado número de secuencias exclusivas si se comparan con las poblaciones Aymará y Quechua.

15. Los haplotipos mitocondriales exclusivos hallados podrían tratarse de linajes antiguos que posiblemente hayan desaparecido por procesos de deriva genética, o que no estén reflejados en el conjunto de la muestra poblacional debido a un tamaño de muestra insuficiente.
16. El estudio de las secuencias del ADNmt (HVRI) mediante *median networks* indica que la mayor parte de las secuencias de las poblaciones del Piedemonte quedan agrupadas por haplogrupos y algunas coinciden con otras poblaciones del Centro y Sur América. La población Quechua se halla en todos los nodos del gráfico.
17. Los resultados obtenidos utilizando ACP, AMOVA y distancias genéticas revelan que las poblaciones que viven en el Piedemonte muestran una mayor similitud con el conjunto de poblaciones del Centro y del Norte de los Andes que con las del Sur de los Andes o las Amazónicas. Estos resultados son los que cabría esperar en las poblaciones Aymará y Quechua que mayoritariamente han vivido en la región andina, pero no para las poblaciones Chimane y Mosetén que presentan características más propias de la zona amazónica.
18. El hecho que en los árboles filogenéticos derivados de las distancias genéticas la población Quechua del Piedemonte muestre una mayor afinidad genética con la población Aymará del Piedemonte que con otras poblaciones Quechua de los Andes puede deberse a peculiaridades histórico-geográficas de estas poblaciones.
19. Los resultados obtenidos revelan que el Piedemonte no fue una barrera genética en el proceso de dispersión humana entre los Andes y el Amazonas, sino más bien un corredor entre estas dos ecorregiones. A pesar de la permeabilidad del área, las poblaciones que vivieron allí mantuvieron de alguna forma su especificidad genética y cultural, evidenciada por la presencia simultánea de antiguos grupos de habla Tucano, Arawak, Andina y Macro-Pano.

Cromosoma Y

20. La distancia genética menor utilizando el haplotipo mínimo del cromosoma Y se halló entre la población del Beni y la población de Perú ($R_{st} = 0,01875$). La distancia genética mayor se halló ante las poblaciones Afro-Colombianas. Los resultados fueron parecidos en el análisis por parejas R_{st} realizado en los gráficos MDS y *Neighbour-Joining*.
21. El análisis SAMOVA dió los mejores resultados de variación genética para los grupos: (A) Beni (Bolivia) / Perú; (B) Afro-Colombianos; (C) Resto de poblaciones.
22. La población del Beni muestra una clara diferenciación respecto otras poblaciones bolivianas estudiadas por otros autores y son las más uniformes de toda la serie analizada. La información genética sugiere que procesos evolutivos tales como deriva genética, selección natural y mezcla genética han modelado la historia demográfica de estos grupos humanos.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR G. 1990. Nuestra vida: aspectos económicos, sociales y culturales Mosetenes. Asociación alemana para la educación de adultos. La Paz, Bolivia.
- ANDERSON S., BANKIER A.T., BARRELL B.G., DE BRUIJN M.H., COULSON A.R., SANGER F., SCHREIER P.H., SMITH A.J.H., STADEN R., YOUNG G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290:457–465.
- ANDREWS R.M., KUBACKA I., CHINNERY P.F., LIGHTOWLERS R.N., TURNBULL D.M., HOWELL N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 23:147.
- ALBÓ X. 1988. Mundo Aymará. Vol. 13 de Alianza América. Alianza. Universidad de Virginia.
- ALBÓ X. 1998. Quechuas y Aymaras. Vol 1. Pueblos indígenas y originarios de Bolivia. Min. de Desarrollo Sostenible y Planificación, Viceministerio de Asuntos Indígenas y Pueblos Originarios. La Paz, Bolivia.
- ALTAMIRANO D.F. 1979. Historia de la Misión de los Mojos. Instituto Boliviano de la Cultura. La Paz, Bolivia.
- ALVES C., GUSMAO L., AMORIM A. 2001. STR data (AmpFISTR Profiler Plus and GenePrint CTTv) from Mozambique. *Forensic Sci. Int.* 119:131-133.
- Applied Biosystems AmpFISTR Yfiler™ PCR Amplification Kit user's manual. Foster City, CA, USA.
- ARANÍBAR C. 1991. Inca Garcilaso de la Vega. Comentarios reales de los Incas II. Ed. Carlos Aranibar. Lima, Perú.
- ARMENTIA N. 1887. Diario del viaje al Madre de Dios, hecho por el P. Fray Nicolás Armentia, en el año de mil ochocientos ochenta y cuatro y mil ochocientos ochenta y cinco, en calidad de comisionado para explorar el Madre de Dios (La Paz, Bolivia).
- ARMENTIA N. 1905. Descripción del territorio de las misiones franciscanas de Apolobamba. La Paz.

- ARROYO PARDO E., BAEZA RITCHER C., TIRADO VIZCAÍNO M. 2010. Cap. 12. Tipos de polimorfismos y aplicaciones forenses. Manual de criminalística y ciencias forenses. Ed. Tebar. Madrid.
- BAILLET G.F., ROTHAMMER F.R., CARNESE F.R., BRAVI C.M., BIANCHI N.O. 1994. Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 55(1):27-33.
- BANDELT H.J., FORSTER P., ROHL A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molec. Biol. Evol.* 16(1):37-48.
- BANDELT H.J., FORSTER P., SYKES B.C., RICHARDS M.B. 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics.* 141:743-753.
- BANDELT H.J., HERRNSTADT C., YAO Y.G., KONG Q.P., KIVISILD T., RENGO C., SCOZZARI R., RICHARDS M., VILLEMS R., MACAULAY V., HOWELL N., TORRONI A., ZHANG Y.P. 2003. Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. *Ann. Hum. Genet.* 67(Pt 6):512-524.
- BALLINGER S.W., SCHURR T.G., TORRONI A., GAN Y.Y., HODGE J.A., HASSAN K., CHEN K.H., WALLACE D.C. 1992. Southern Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient Mongoloid migrations. *Genetics.* 130:139-152.
- BARBA J., CANAL E., GARCÍA E., JORDÁ E., MIRÓ M., PASTÓ E., PLAYÀ R., ROMERO I., VIA M.Y., WOYNAROVICH E. 2003. Moxos: una limnocultura. Cultura y medio natural en la Amazonia boliviana. CEAM. Barcelona.
- BARRANTES R., FERRELL R.E., CHAKRABORTY R. 1999. Genetic variation at twenty-three microsatellite loci in sixteen human populations. *J. Genet.* 78:99-121.
- BARNADAS J.M. 1985. Introducción a la obra del padre Eder: Breve descripción de las Reducciones de Mojos. Cochabamba: Historia Boliviana.
- BATANIAN J.R., LEDBETTER S.A., WOLFF R.K., NAKAMURA Y., WHITE R., DOBYNS W.B., LEDBETTER D.H. 1990. Rapid diagnosis of Miller-Dieker syndrome and isolated lissencephaly sequence by the polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 85:555-559.

- BATISTA O., KOLMAN C.J., BERMINGHAM E. 1995. Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panama. *Hum. Mol. Genet.* 4(5):921-929.
- BERT F., CORELLA A., GENÉ M., PÉREZ-PÉREZ A., TURBÓN D. 2001. Major Mitochondrial DNA Haplotype Heterogeneity in Highland and Lowland Amerindian Populations from Bolivia. *Hum. Biol.* 73:1-16.
- BERT F., CORELLA A., GENÉ M., PÉREZ-PÉREZ A., TURBÓN D. 2004. Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracare Amerindian populations from Bolivia lowlands. *Annals of Human Biology.* 31(1):9-28.
- BLOCK D. 1980. In search of El Dorado: Spanish entry into Moxos, A Tropical Frontier, 1550-1767. Dissertation presented to the Faculty of the Graduate School of The University of Texas, Austin.
- BOBROW M., PEARSON P.L., PIKE M.C., EL-ALFI O.S. 1971. Length variation in the quinacrine-binding segment of human Y chromosomes of different sizes. *Cytogenetics.* 10(3):190-198.
- BOGENHAGEN D.F., SAKONJU S., BROWN D.D. 1980. A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell.* 19:27-35.
- BOERWINKLE E., XIONG W.J., FOUREST E., CHAN L. 1989. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86(1):212-216.
- BONATTO S.L., REDD A.J., SALZANO F.M., STONEKING M. 1994. Lack of ancient Polynesian-Amerindian contact. *Am. J. Hum. Genet.* 55(1):7-11.
- BONATTO S.L., SALZANO F.M. 1997. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94(5):1866-1871.
- BOOM B. 1989. Use of plan resource by the chacobo. En: Posey D. & Baley W. Resource management in Amazonia: indigenous and folk tragedies. The New York Botanical Garden Press. New York.
- BOSCH E., CLARIMÓN J., PÉREZ-LEZAUN A., CALAFELL F. 2001. STR data for 21 loci in northwestern Africa. *Forensic Sci. Int.* 116:41-51.

- BRIÓN M., SANCHEZ J.J., BALOGH K., THACKER C., BLANCO-VEREA A., BØRSTING C., STRADMANN-BELLINGHAUSEN B., BOGUS M., SYNDERCOMBE-COURT D., SCHNEIDER P.M., CARRACEDO A., MORLING N. 2005. Introduction of an single nucleotide polymorphism-based "Major Y-chromosome haplogroup typing kit" suitable for predicting the geographical origin of male lineages. *Electrophoresis*. 26(23):4411-4420.
- BUDOWLE B., NHARI L.T., MORETTI T.R., KANOYANGWA S.B., MASUKA E., DEFENBAUGH D.A., SMERICK J.B. 1997. Zimbabwe black population data on the six short tandem repeat loci - CSF1PO, TPOX, TH01, D3S1358, VWA, and FGA. *Forens. Sci. Int.* 90:215-221.
- BUILES J.J., MARTÍNEZ B., GÓMEZ A., CARABALLO L., ESPINAL C., AGUIRRE D., MONTOYA A., MORENO M., AMORIM A., GUSMÃO L., BRAVO M.L. 2007. Y chromosome STR haplotypes in the Caribbean city of Cartagena (Colombia). *Forensic Sci. Int.* 167(1):62-69.
- CAINÉ L., CORTE-REAL F., VIEIRA D.N., CARVALHO M., SERRA A., LOPES V., VIDE M.C. 2005. Allele frequencies and haplotypes of 8 Y-chromosomal STRs in the Santa Catarina population of southern Brazil. *Forensic Sci. Int.* 148(1):75-79.
- CANN R.L. 1994. mtDNA and Native Americans: a Southern perspective. *Am. J. Hum. Genet.* 55(1):7-11.
- CALANDRA H.A., SALCEDA S.A. 2004. Amazonia boliviana: arqueología de los llanos de Mojos. *Acta Amazónica*. Vol. 34(2):155-163.
- CAPRILES J.M., REVILLA C. 2006. Ocupación Inka en la región Kallawaya: Oralidad, Etnohistoria y arqueología de Camata, Bolivia. *Chungará* V.38(2).
- CARDÚS J. 1886. Misiones franciscanas entre los infieles de Bolivia, descripción del estado de ellas. Barcelona. Librería de la Inmaculada Concepción.
- CARVAJAL DE G. 1934. Discovery of the Orellana River. En *The discovery of the Amazon according to the accounts of friar Gaspar de Carvajal and other documents*. Edited by H.C. Heaton, pp.167-235. New York: American Geographical Society.
- CASTILLO F. 1988. Breve crónica de algunos pueblos tribales de la Amazonia boliviana. *Journal de la Société des Américanistes*. Tome 74:193-195 (a).

- CASTILLO F. 1988. Chimanes, cambas y collas: las relaciones interétnicas en las tierras bajas y tropicales del Beni. La Paz: Don Bosco. 1982-1985 (b).
- CAVALLI-SFORZA L.L., EDWARDS A.W.F. 1967. Phylogenetic análisis: Models and estimation procedures. *Evolution* 32:550-570.
- CENSO I INDÍGENA DE TIERRAS BAJAS, BOLIVIA. 1994. Secretaría Nacional de Asuntos Étnicos, Género y Generacionales, INE, ASDI, CIDOB y PNUD. 3 vol.: Amazonía, Oriente y Chaco. La Paz, Bolivia
- CENSO NACIONAL DE POBLACIÓN Y VIVIENDA. 2001. 10 vol. INE. La Paz, Bolivia.
- CERRÓN-PALOMINO R. 1987. Unidad y diferenciación lingüística en el mundo andino. *Lexis*. 11(1):71-104.
- CHICCHON A. 1992. Chimane resource use and market involvement in the Beni Biosphere Reserve, Bolivia. A dissertation presented to the Graduate School of the University of Florida for the degree of Doctor of Philosophy, University of Florida.
- CIOCHON R.L., BETTIS E.A. 2009. 3rd. Palaeoanthropology: Asian Homo erectus converges in time. *Nature*. 458(7235):153-4.
- CHIOVOLONE, M. 1996. Caracterización y evaluación de las estrategias de manejo de recursos naturales del pueblo Tacana. La Paz: SAE – PNUD. Proyecto piloto para el desarrollo sostenible del pueblo Tacana de la provincia Iturrealde. La Paz, Bolivia .
- CHEN Y.S., OLCKERS A., SCHURR T.G., KOGELNIK A.M., HUOPONEN K., WALLACE D.C. 2000. mtDNA Variation in the South African Kung an Khwe- and their genetic relationship to other African populations. *Am. J. Hum. Genet.* 66(4):1362-1383.
- COMAS D., CALAFELL F., MATEU E., PÉREZ-LEZAUN A., BOSCH E., MARTÍNEZ-ARIAS R., CLARIMON J., FACCHINI F., FIORI G., LUISELLI D., PETTENER D., BERTRANPETIT J. 1998. Trading genes along the silk road: mtDNA sequences and the origin of central Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 63(6):1824-1838.
- COVEY R.A. 2006. How the Incas built their Heartland. State Formation and the innovation of Imperial Startegies in the Sacred Valley, Peru. The University of Michigan Press, USA.

- CIDDEBENI. 1990. Diagnóstico socio-económico del Bosque de Chimanes, 1a fase: El problema de la territorialidad de los pueblos indígenas. Informe final. Trinidad.
- CORDEAUX R., WEISS G., SHA N., STONEKING M. 2004. The Northeast Indian passageway: a barrier or corridor for human migrations? *Molecular Biology and Evolution*. 21:1525-1533.
- CORELLA A., BERT F., PÉREZ-PÉREZ A., GENÉ M., TURBÓN D. 2007. Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian Populations in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Mosestén, Aymara and Quechua. *Annals of Human Biology*. 34:34-55.
- CORELLA A., BERT F., PÉREZ-PÉREZ A., GENÉ M., TURBÓN D. 2008. HUMTH01, HUMVWA31A, HUMCSF1PO and HUMTPOX polymorphisms in Amerindian populations living in the Beni Department of Bolivia. *Annals of Human Biology*. 35(5):556-564.
- CRUCIANI F., SANTOLAMAZZA P., SHEN P., MACAULAY V., MORAL P., OLCKERS A., MODIANO D., HOLMES S., DESTRO-BISOL G., COIA V., WALLACE D.C., OEFNER P.J., TORRONI A., CAVALLI-SFORZA L.L., SCOZZARI R., UNDERHILL P.A. 2002. A back migration from Asia to Sub-Saharan Africa is supported by high-resolution analysis of human Y-chromosome haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 70(5):1197-1214.
- DAILLANT I. 1994. Sens dessus - dessous. Organization sociale et spatiale de chimanes d'Amazonie bolivienne. Université de Paris X-Nanterre (tesis doctoral).
- DEKA R., CHAKRABORTY R., DECROO S., ROTHHAMMER F., BARTON S.A., FERRELL R.E. 1992. Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to the apolipoprotein B gene in five human populations. *Am. J. Hum. Genet.* 51(6):1325-1333.
- DEKA R., SHRIVER M.D., YU L.M., MUELLER HEIDREICH E., JIN L., ZHONG Y., MCGARVEY S.T., SWARUP AGARWAL S., BUNKER C.H., MIKI T., HUNDRIESER J., YIN S.-J., RASKIN S., BARRANTES R., FERRELL R.E., CHAKRABORTY R. 1999. Genetic variation at twenty-three microsatellite loci in sixteen human populations. *J. Genet.* 78:99-121.

- DE PANCORBO M.M., CASTRO A., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ I., GARCÍA-ORAD A. 1998. Population genetics and forensic applications using multiplex PCR (CSF1PO, TPOX, and TH01) loci in the Basque Country. *J. Forensic Sci.* 43:1181-1187.
- DE SOUZA GÓES A.C., DE CARVALHO E.F., GOMES I., DA SILVA D.A., GIL E.H., AMORIM A., GUSMÃO L. 2005. Population and mutation analysis of 17 Y-STR loci from Rio de Janeiro (Brazil). *Legal Med.* 119(2):70-76.
- DE KNIJFF P., KAYSER M., CAGLIÀ A., CORACH D., FRETWELL N., GEHRIG C., GRAZIOSI G., HEIDORN F., HERRMANN S., HERZOG B., HIDDING M., HONDA K., JOBLING M., KRAWCZAK M., LEIM K., MEUSER S., MEYER E., OESTERREICH W., PANDYA A., PARSON W., PENACINO G., PEREZ-LEZAUN A., PICCININI A., PRINZ M., ROEWER L. 1997. Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int. J. Legal Med.* 110(3):134-149.
- DEMARCHI D.A., PANCETA-DUTARY G.M., MOTRAN C.C., BASUALDO M.A.I., MARCELLINO A.J. 2001. Mitochondrial DNA haplogroups in Amerindian populations from the Gran Chaco. *Am. J. Phys. Anthropol.* 115:199-203.
- DENEVAN W. 1966. *The Aboriginal Cultural Geography of the Llanos de Mojos of Bolivia.* Ibero-Americana: 48. Berkeley - Los Angeles.
- DENEVAN W. 2001. *Cultivated landscapes of native Amazonia and the Andes.* Oxford University Press. Oxford.
- DERENKO M.V., DAMBUEVA I.K., MALIARCHUK B.A., DORZHU C.H.M., ZAKHAROV I.A. 1999. Structure and diversity of the mitochondrial gene pool of the aboriginal population of Tuva and Buriatia from restriction polymorphism data *Genetika.* 35(12):1706-1712.
- DÍEZ ASTETE A., MURILLO D. 1998. *Pueblos indígenas de tierras bajas.* La Paz: MDSP-VAIPO-PNUD.
- DÍEZ ASTETE A. 2004. *Sobre Antropología de urgencia en Bolivia: Pueblos étnicos en situación de vulnerabilidad y aislamiento.* La Paz, Bolivia.
- DILLEHAY T.D. 1999. The late Pleistocene cultures of South America. *Evol. Anthropol.* 7(6):206-216.

- DIXON E.J. 2001. Human colonization of the Americas: timing, technology and process. *Quaternary Science Reviews*. 20:277-279.
- DRANSART P. 1996. Kay Pacha: Cultivating Earth and water in the Andes. *British Archaeological Reports International*. 1478.
- DNA recommendations. 1992. Report concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms. *Int. J. Legal Med.* 105:63-64.
- DNA recommendations. 1994. Report concerning further recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics regarding PCR-based-polymorphisms in STR systems. *Int. J. Legal Med.* 107:159-160.
- D'ORBIGNY A. 1944. *El hombre americano*. Ed. Futuro. Buenos Aires.
- DORNELLES C.L., BATTILANA J., FAGUNDES N.J.R., FREITAS L.B., BONATTO S.L. 2004. Mitochondrial DNA and Alu Insertions in a Genetically Peculiar Population: The Ayoreo Indians of Bolivia and Paraguay. *Am. J. Hum. Biol.* 16:479-488.
- DUDLEY M. 2009. Mobility and migration in indigenous. *Contemporary ethnoecological perspectives*. Vol. 11. *Studies in environmental anthropology and ethnobiology*. Alexiades Miguel N. Ed. Berghahn Books, New York – Oxford.
- DUPANLOUP I., SCHNEIDER S., EXCOFFIER L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11(12):2571-2581.
- EDWARDS A., HAMMOND H.A., JIN L., CASKEY C.T., CHAKRABORTY R. 1992. Genetic variation at five Trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12:241-253.
- EGUILUZ DE D. 1884. (1696). *Historia de la misión de Mojos*. Lima Imprenta Universo.
- ERICKSON C.L. 1995. Archaeological perspectives on ancient landscapes of the Llanos de Mojos in Bolivian Amazon. En Peter Sthal, editor. *Archaeology in the American Tropics: Current analytical methods and applications*. Cambridge: Cambridge University Press. Pp.66-95.
- ERICKSON C.L. 1999. Neo-environmental determinism and agrarian "collapse" in Andean prehistory. *Antiquity*. 73:634-642.

- ERICKSON C.L. 2000. Lomas de ocupación en los Llanos de Moxos. En *Arqueología de las Tierras Bajas*. Ed. por Alicia Durán Coirolo y Roberto Bracco Boksar. Comisión Nacional de Arqueología, Ministerio de Educación y Cultura, Montevideo, Uruguay. Pp.207-226.
- ERICKSON C.L. 2006. Time and complexity in historical ecology. *Studies in the Neotropical Lowlands*. Edited by William Balée and Clark L. Erickson. Columbia University Press. New York.
- EWENS W.J. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Popul. Biol.* 3:87-112.
- EXCOFFIER L., LANGANEY A. 1989. Origin and differentiation of human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 44:73-85.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P.E., QUATTRO J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 1992:479-491.
- FAGUNDES N.J., KANITZ R., ECKERT R., VALLS A.C., BOGO M.R., SALZANO F.M., SMITH D.G., SILVA W.A. JR., ZAGO M.A., RIBEIRO-DOS-SANTOS A.K., SANTOS S.E., PETZL-ERLER M.L., BONATTO S.L. 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(3):583-592.
- FAHMY T. 1995. XLSTAT (7.5.2) Software. New York: Addinsoft.
- FARRIS J.S. 1972. Estimating phylogenetic trees from distance metrics. *Am. Nat.* 106:645-668.
- FELSENSTEIN J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.572c. Distribution by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle W.A.
- FISHER R.A. 1951. Standard calculations for evaluating a blood-group system. *Heredity.* 5(1):95-102.
- FLUGER C.H., SABELIA J., CABOT L., KINGENDALL. 1994. Los indígenas ese ejja de la amazonía boliviana: observaciones etnológicas y ecológicas. En Instituto de Ecología, Documentos de biología, 1. La Paz, UMSA.

- FONDEVILA M., JAIME J.C., SALAS A., LAREU M.V., CARRACEDO A. 2003. Y-chromosome STR haplotypes in Córdoba (Argentina). *Forensic Sci. Int.* 137(2-3):217-220.
- FORSTER P., HARDING R., TORRONI A., BANDELT H-J. 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Am. J. Hum. Genet.* 59:935-945.
- FORSTER P. 2004. Ice Ages and the mitochondrial DNA chronology of human dispersals: a review. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359:255-264.
- FU Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* 147:915-925.
- FUSELLI S., TARAZONA-SANTOS E., DUPANLOUP I., SOTO A., LUISELLI D., PETTENER D. 2003. Mitochondrial DNA Diversity in South America and the Genetic History of Andean Highlanders. *Mol. Biol. Evol.* 20(10):1682-1691.
- GANTIER B. 1991. Indios de Mojos y Jesuitas: origenes de una cristiandad. Audiencias de Charcas. Siglos XVII y XVIII. Disertación. Facultad de Teología de la Universidad de Comillas, Cantabria.
- GARCÍA-BOUR J., PÉREZ-PÉREZ A., ÁLVAREZ S., FERNÁNDEZ E., LÓPEZ-PARRA A.M., 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. *Am. J. Phys. Anthropol.* 123:361-370.
- GARCÍA, P. 1997. Caracterización preliminar de los beneficiarios de la TCO Chacobo - Pacahuara. La Paz: SAE (ms.).
- GAVIRIA A.A., IBARRA A.A., PALACIO O.D., POSADA Y.C., TRIANA O., OCHOA L.M., ACOSTA M.A., BRIÓN M., LAREU M.V., CARRACEDO A. 2005. Y-chromosome haplotype analysis in Antioquia (Colombia). *Forensic Sci. Int.* 151(1):85-91.
- GENÉ M., HUGUET E., MORENO P., SÁNCHEZ C., CARRACEDO A., CORBELLA J. 1996. Population study of the STRs HUMTH01 (including a new variant) and HUMVWA31A in Catalonia (northeast Spain). *Int. J. Legal Med.* 108(6):318-320.

- GENÉ M., HUGUET E., SÁNCHEZ-GARCÍA C., MORENO P., CORBELLA J., MEZQUITA J. 1995. Suitability of the YNZ22 (D17S5) VNTR polymorphism for legal medicine investigations in the population of Catalonia (Spain). *Int. J. Legal Med.* 107(4):222-224.
- GENÉ M., HUGUET E., SÁNCHEZ-GARCÍA C., MORENO P., CORBELLA J., MEZQUITA J. 1995. Study of the 3'-ApoB minisatellite performed by PCR in the population of Catalonia (northeast Spain). *Hum. Hered.* 45(2):70-74.
- GENÉ M., CARRACEDO A., HUGUET E., PÉREZ-PÉREZ A., MORENO P. 1998. Population genetics of the D12S391, CSF1PO and TPOX loci in Catalonia (Northeast Spain). *Int. J. Legal Med.* 111:52-54.
- GENÉ M., FUENTES M., HUGUET E., PIQUE E., BERT F., CORELLA A., PEREZ-PÉREZ A., CORBELLA J., MORENO P. 1998. Quechua amerindian population characterized by HLA-DQA1, YNZ22, 3'APO B, HUMTH01 and HUMVWA31A polymorphisms. *J. Forensic Sci.* 43(2):403-405.
- GENÉ M., MORENO P., BORREGO N., PIQUE E., XIFRO A., FUENTES M., BERT F., CORELLA A., PEREZ-PÉREZ A., TURBON D., CORBELLA J., HUGUET E. 2000. Population study of Aymara Amerindians for the PCR-DNA polymorphisms HUMTH01, HUMVWA31A, D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253, YNZ22 and HLA-DQA1. *Int. J. Legal Med.* 113:126-128.
- GINTHER C., CORACH D., PENACINO G.A., REY J.A., CARNESE F.R., HUTZ M.H., ANDERSON A., JUST J., SALZANO F.M., KING M.C. 1993. Genetic Variation among the Mapuche Indians from the Patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes. En: Pena S.D.J., Chakraborty R., Epplen J.T., Jeffreys A.J. editors. *DNA fingerprinting: state of the science*. Basel: Birkhauser Verlag. Pp.290-324.
- GISBERT T. 1980. *Iconografía y mitos indígenas*. Ed. Gisbert. La Paz.
- GRATTAPAGLIA D., KALUPNIEK S., GUIMARÃES C.S., RIBEIRO M.A., DIENER P.S., SOARES C.N. 2005. Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. *Forensic Sci. Int.* 149(1):99-107.
- GREENBERG J.H. 1987. *Language in the Americas*. Stanford: Stanford University Press.

- GOICOCHEA A.S., CARNESE F.R., DEJEAN C.B., AVENA S.A., WEIMER T.A., FRANCO M.H., CALLEGARI-JACQUES S., ESTALOTE A., SIMOES M.L., PALATNIK M. 2001. Genetic relationships between Amerindian populations of Argentina. *Am. J. Phys. Anthropol.* 115:113-143.
- GUAPINDAIA V. 2001. "Encountering the ancestors: The Maracá urns". En *Unknown Amazon: Culture in nature in ancient Brazil*. Edited by C. McEwan, C. Barreto and E. Neves, pp.156-173. London: The British Museum Press.
- GUO S., THOMPSON E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- GUSMÃO L., BUTLER J.M., CARRACEDO A., GILL P., KAYSER M., MAYR W.R., MORLING N., PRINZ M., ROEWER L., TYLER-SMITH C., SCHNEIDER P.M. 2006. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci. Int.* 157(2-3):187-197.
- HANDT O., MEYER S., VON HAESLER A. 1998. Compilation of human mtDNA control region sequences. *Nucleic Acids Research.* 26(1):126-129.
- HECKENBERGER M. 1996. War and peace in the shadow of empire: Sociopolitical change in the upper Xingu of southeastern Amazonia, A.D. 1400–2000. Ph.D. diss., University of Pittsburgh. Pittsburgh, Pa.
- HECKENBERGER M., PETERSEN J.B., NEVES E.G. 1999. Village permanence in Amazonia: Two archaeological examples from Brazil. *Latin American Antiquity* 10(4):353-376.
- HECKENBERGER M. 2002. Rethinking the Arawakan diaspora: Hierarchy, regionality, and the Amazonian Formative en Comparative Arawakan histories: Rethinking language family and culture area in Amazonia. Edited by J. D. Hill and F. Santos-Granero, University of Illinois Press.

- HERNSTADT C., ELSON J.L., FAHY E., PRESTON G., TURNBULL D.M., ANDERSON C., GHOSH S.S., OLEFSKY J.M., BEAL M.F., DAVIS R.E., HOWELL N. 2002. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.* 70(5):1152-1171. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed&cmd=link&linkname=pubmed_pubmed&uid=2649919
- HERTZBERG M., MICKLESON K.N., SERJEANTSON S.W., PRIOR J.F., TRENT R.J. 1989. An Asian-specific 9-bp deletion of mitochondrial DNA is frequently found in Polynesians. *Am. J. Hum. Genet.* 44(4):504-510.
- HEY J. 2005. On the number of New World founders: A population genetic portrait of the peopling of the Americas. *PLoS Biol.* (6):e193.
- HIGGINS D.G., BLEASBY A.J., FUCHS R. 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Cabios.* 8, 189-191.
- HORAI S., HAYASAKA K. 1990. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 46:828-842.
- HORAI S., KONDO R., NAKAGAWA H.Y., HAYASHI S., SONODA S., TAJIMA K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10(1):23-47.
- HORAI S., MURAYAMA K., HAYASAKA K., MATSUBAYASHI S., HATTORI Y., FUCHAROEN G., HARIHARA S., PARK K.S., OMOTO K., PAN I.H. 1996. mtDNA polymorphism in East Asian Populations, with special reference to the peopling of Japan. *Am. J. Hum. Genet.* 59(3):579-590.
- HORNBORG A. 1998. Serial redundancy in Amazonian social structure. *En Transformations of kinship.* Edited by M. Godelier, T.R. Trautmann and F. Tjon Sie Fat, pp.168-186. Washington: Smithsonian Institution Press.
- HORNBORG A. 2005. Ethnogenesis, Regional Integration and Ecology in Prehistoric Amazonia. *Current Anthropology.* 46(4):589-620.
- HOU Y., LI Y., WU J., TANG J., PRINZ M. 2000. Polymorphisms of 13 STR markers in Chinese population. *Progr. Forensic Genet.* 8:242-244.

- HUANG E.N., SCHUMM J., BUDOWLE B. 1995. Chinese population data on three tetrameric short tandem repeat loci – HUMTH01, CSF1PO and TPOX – derived using multiplex PCR and manual typing. *Forensic Sci. Int.* 71:131-136.
- HUGUET E., GENÉ M., CORBELLA J., MORENO P. 1993. Distribution of the HLA-DQ alpha alleles and genotypes in a sample of a population from Barcelona (Spain). *Hum. Hered.* 43(5):326-328.
- HUGUET E., BORREGO N., PINHEIRO M.F., LUNA M., CORBELLA J., MAS J., GENÉ M., MORENO P. 1998. Annobon Island population (Equatorial Guinea) characterised by five VNTRs-PCR polymorphisms. *Progr. Forensic Genet.* 7:329-331.
- HURLES M.E., SYKES B.C., JOBLING M.A., FORSTER P. 2005. The dual origin of the Malagasy in Island Southeast Asia and East Africa: evidence from maternal and paternal lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 76(5):894-901.
- IANNACONE G.C., TITO R.Y., LOPEZ P.W., MEDINA M.E., LIZARRAGA B. 2005. Y-chromosomal haplotypes for the PowerPlex Y for twelve STRs in a Peruvian population sample. *J. Forensic Sci.* 50(1):239-242.
- INGMAN M., KAESSMANN H., PÄÄBO S., GYLLENSTEN U. 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 408:708-713.
- INE-CELADE. Segunda encuesta demográfica 1980. La Paz, Bolivia.
- JIN H.J., KWAK K.D., HONG S.B., SHIN D.J., HAN M.S., TYLER-SMITH C., KIM W. 2006. Forensic genetic analysis of mitochondrial DNA hypervariable region I/II sequences: An expanded Korean population database. *Forensic Sci. Int.* 158(2-3):125-130
- JOBLING M.A., SAMARA V., PANDYA A., FRETWELL N., BERNASCONI B., MITCHELL R.J., GERELSAIKHAN T., DASHNYAM B., SAJANTILA A., SALO P.J., NAKAHORI Y., DISTECHE C.M., THANGARAJ K., SINGH L., CRAWFORD M.H., TYLER-SMITH C. 1996. Recurrent duplication and deletion polymorphisms on the long arm of the Y chromosome in normal males. *Hum. Mol. Genet.* 5(11):1767-1775.

- JOBLING M.A., GILL P. 2004. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat. Rev. Genet.* 5(10):739-751. Review Erratum in: *Nat. Rev. Genet.* 2005 6(3):246.
- JOBLING M.A., LO I.C., TURNER D.J., BOWDEN G.R., LEE A.C., XUE Y., CARVALHO-SILVA D., HURLES M.E., ADAMS S.M., CHANG Y.M., KRAAIJENBRINK T., HENKE J., GUANTI G., MCKEOWN B., VAN OORSCHOT R.A., MITCHELL R.J., DE KNIJFF P., TYLER-SMITH C., PARKIN E.J. 2007. Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. *Hum. Mol. Genet.* 16(3):307-316.
- KARAFET T.M., MENDEZ F.L., MEILERMAN M.B., UNDERHILL P.A., ZEGURA S.L., HAMMER M.F. 2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* 18(5):830-838.
- KEIM H. 1970. Chacobo: un grupo residual de los panos surorientales en el oriente de Bolivia. La Paz. Instituto Nacional de Antropología.
- KILLEEN T.J., GUERRA A., CALZADA M., CORRA L., CALDERÓN V., SORIA L., QUEZADA B., STEININGER M.K. 2008. Total historical Land-Use in Eastern Bolivia: Who, when and how much? *Ecology and Society* 13(1):36.
- KIMPTON C., WALTON A.P., GILL P.A. 1992. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the VWA gene. *Hum. Mol. Genetics.* 1:287.
- KITTLES R.A., BERGEN A.W., URBANEK M., VIRKKUNEN M., LINNOILA M., GOLDMAN D., LONG J.C. 1999. Autosomal, mitochondrial, and Y chromosome DNA variation in Finland: Evidence for a male-specific bottleneck. *Am. J. Phys. Anthropol.* 108:381-399.
- KIVISILD T., TOLK H.V., PARIK J., WANG Y., PAPIHA S.S., BANDELT H.J., VILLEMS R. 2002. The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree. *Mol. Biol. Evol.* 19:1737-1751.
- KLINTSCHAR M., KOZMA Z., AL HAMMADI N., ABDULL FATAH M., NÖHAMMER C. 1998. A study on the short tandem repeat systems HumCD4, HumTH01 and HumFIBRA in population samples from Yemen and Egypt. *Int. J. Legal Med.* 111:107-109.

- KOBILINSKY L. 1992. Recovery and stability of DNA in samples of forensic science significance. *Forensic Science Review*. 4(1):68-87.
- KONG QING-PENG, YAO YONG-GANG, SUN CHANG, BANDELT HANS-JÜRGEN, ZHU CHUN-LING, ZHANG YA-PING. 2003. Phylogeny of East Asian Mitochondrial DNA Lineages Inferred from Complete Sequences. *Am. J. Hum. Genet.* 73(3):671-676.
- KOLMAN C.J., BERMINGHAM E., COOKE R., WARD R.H., ARIAS T.D., GUIONNEAU-SINCLAIR F. 1995. Reduced mtDNA Diversity in the Ngöbe Amerinds of Panamá. *Genetics*. 140:275-283.
- KOLMAN C.J., SAMBUUGHIN N., BERMINGHAM E. 1996. Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders. *Genetics*. 142(4):1321-1334.
- KOLMAN C.J., BERMINGHAM E. 1997. Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Choco and Chibcha Amerinds of Panama. *Genetics*. 147(3):1289-1302.
- KUMAR S., TAMURA K., JAKOBSEN I.B., NEI M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Arizona State University. Tempe, Arizona, USA.
- KUPCHIK C. 2008. La leyenda de el Dorado y otros mitos del descubrimiento de América. Colección: Historia Incógnita. Ed. Santos Rodríguez, Madrid.
- KWOK S., HIGUCHI R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 339:237-238.
- LATHRAP D.W. 1970. *The Upper Amazon*. London: Thames and Hudson.
- LALUEZA C., PÉREZ-PÉREZ A., PRATS E., CORNUDELLA L., TURBON D. 1997. Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum. Mol. Genet.* 6:41-46.
- LALUEZA C., LUNA F., CALAFELL F., MORERA B., BERTRANPETIT J. 2001. MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean. *Ann. Hum. Genet.* 65:137-151.
- LEE K. 1979. 7.000 años de historia del hombre de Mojos: Agricultura en pampas estériles, informe preliminar. Universidad Técnica del Beni, Trinidad.

- LEE J., EWIS A.A., HURLES M.E., KASHIWAZAKI H., SHINKA T., NAKAHORI Y. 2007. Y chromosomal STRs haplotypes in two populations from Bolivia. *Leg. Med. (Tokyo)*. 9(1):43-47.
- LEHM Z. 1993. *Bosque de Chimanes: un escenario de conflictos sociales 1986-1993*. Trinidad: CIDDEBENI.
- LEWIS C.M., TITO R.Y., LIZÁRRAGA B., STONE A.C. 2005. Land Language and loci: mtDNA HVI in Native Americans and the genetic history of Perú. *Am. J. Phys. Anthropol.* 127:351-360.
- LI J., varios autores. 2009. HUGO Pan-Asian SNP Consortium,. Mapping Human Genetic Diversity in Asia, 2009, *Science*. 326(5959) 1541-1545
- LIBERMAN K., GODINEZ A. 1992. *Territorio y dignidad: pueblos indígenas y medio ambiente en Bolivia*. Caracas: ILDIS. Nueva Sociedad.
- LOBATO-DA-SILVA D.F., RIBEIRO-DOS-SANTOS A.K.C., SANTOS S.E.B. 2001. Diversidade genética de populações humanas na Amazõnia. En Vieira I.C.G., Silva J.M.C., Oren D.C., D'Incao M.A. orgs. *Diversidade Humana e Cultural na Amazõnia*. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi. Pp.167-193.
- LÓPEZ-PARRA A.M., TIRADO M., BAEZA C., BERT F., CORELLA A., PÉREZ-PÉREZ A., GAMBA C., FERNÁNDEZ E., ARROYO-PARDO E. 2008. Genetic structure of the population of Beni department (North Bolivia). *For. Sci. Int.* 1:348-349.
- LORENZ J.G., SMITH D.G. 1996. Distribution of four founding mtDNA haplogroups among Native North Americans. *American Journal of Physical Anthropology*. 101(3):307-323.
- LUM J.K., CANN R.L., MARTINSON J.J., JORDE L.B. 1998. Mitochondrial and nuclear genetic relationships among Pacific Island and Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 3(2):613-24.
- LYNCH T.F. 1983. The Paleo-Indians. En Jennings J.D. Ed. *Ancient South Americans* San Francisco: W. H. Freeman. Pp.87-138.
- LYNCH T.F. 1990. Glacial-age man in South America? A critical review. *Am. Antiquity* 55:12-36.

- MALYARCHUK B.A., ROGOZIN I.B., BERIKOV V.B., DERENKO M.V. 2002. Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. *Hum. Genet.* 111(1):46-53.
- MARGULIS L., OLENDZENSKI L., AFZELIUS B.A. 1990. Endospore forming filamentous bacteria symbiotic in termites: ultrastructure and growth in culture of *Arthomitus*. *Symbiosis* 8:95-116.
- MARTÍNEZ-JARRETA B., DIAZ ROCHE P., BUDOWLE B., ABECIA E., CASTELLANO M., CASALOD Y. 1998. Pyrenean population data on 3 tetrameric short tandem repeat loci - HUMTH01, TPOX and CSF1PO-derived using a STR multiplex system. *Progr. Forensic Genet.* 7:312-314.
- MAY J.H., ARGOLLO J., VEIT H. 2008. Holocene landscape evolution along the Andean piedmont, Bolivian Chaco. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology.* 260(3-4):505-520.
- MEGGERS B. 1987. The early history of man in Amazonia. En *Biogeography and quaternary history in tropical America*. Edited by T.C. Whitmore & G.T. Prance. Pp.151-174. Oxford: Clarendon Press.
- MELTON T., PETERSON R., REDD A.J., SAHA N., SOFRO A.S., MARTINSON J., STONEKING M. 1995. Polynesian genetic affinities with Southeast Asian populations as identified by mtDNA analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 57(2):403-414.
- MELTON T., CLIFFORD S., MARTINSON J., BATZER M., STONEKING M. 1998. Genetic evidence for the proto-Austronesian homeland in Asia: mtDNA and nuclear DNA variation in Taiwanese aboriginal tribes. *Am. J. Hum. Genet.* 63(6):1807-1823.
- MERRIWETHER D.A., ROTHHAMMER F., FERRELL R.E. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98(4):411-430.
- MERRIWETHER D.A., KEMP B.M., CREWS D.E., NEEL J.V. 2000. Gene flow and genetic variation in the Yanomama as revealed by mitochondrial DNA. En *America Past, America Present: Genes and Languages in the Americas and Beyond*. Ed. Renfrew C. McDonald Institute for Archaeological Research. Cambridge, UK. Pp.84-124.

- MERRIWETHER D.A., FERRELL R.E. 1996. The four founding lineage hypothesis for the New World: A critical reevaluation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5(1):241-243.
- MERRIWETHER D.A., FERRELL R.E., ROTHHAMMER F. 1995a. mtDNA D-loop 6-bp deletion found in the Chilean Aymara: not a unique marker for Chibcha-speaking Amerindians [letter]. *Am. J. Hum. Genet.* 56(3):812-813.
- MERRIWETHER D.A., ROTHHAMMER F., FERRELL R.E. 1995b. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98(4):411-430.
- MESA N.R., MONDRAGÓN M.C., SOTO I.D., PARRA M.V., DUQUE C., ORTIZ-BARRIENTOS D., GARCÍA L.F., VELEZ I.D., BRAVO M.L., MÚNERA J.G. 2000. Autosomal, mtDNA and Y-chromosome diversity in Amerinds: Pre- and post-Columbian patterns of gene flow in South America. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1277-1286.
- MÉTRAUX A. 1948. The Guaraní. En *Handbook of South American Indians*. Vol. 3. Ed. J. Steward. Smithsonian Institution, Bureau of American Ethnology, Bulletin 143. Washington D.C.
- MEYERS R. 2002. Cuando el Sol caminaba por la Tierra. Orígenes de la intermediación Kallawaya. Plural editores. La Paz, Bolivia.
- MICHAELS G.S., HAUSWIRTH W.W., LAIPIS P.J. 1982. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev. Biol.* 94:246-251.
- MISHMAR D., RUIZ-PESINI E., GOLIK P., MACAULAY V., CLARK A.G., HOSSEINI S., BRANDON M., EASLEY K., CHEN E., BROWN M.D., SUKERNIK R.I., OLCKERS A., WALLACE D.C. 2003. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(1):171-176.
- MONA S., GRUNZ K.E., BRAUER S., PAKENDORF B., CASTRÌ L., SUDOYO H., MARZUKI S., BARNES R.H., SCHMIDTKE J., STONEKING M., KAYSER M. 2009. Genetic admixture history of Eastern Indonesia as revealed by Y-chromosome and mitochondrial DNA analysis. *Mol. Biol. Evol.* 26(8):1865-1877.
- MONTAÑO M. 1987 *Guía etnográfica de Bolivia*. La Paz: Don Bosco.

- MONTES DE OCA I. 1989. Geografía y Recursos naturales de Bolivia. Editorial Educativa del Ministerio de Educación y Cultura. La Paz, Bolivia.
- MONTES DE OCA I. 1995. Geografía y clima de Bolivia. Bull. Inst. Fr. Études Andines. 24(3):357-368.
- MONTES DE OCA I. 2001. Enciclopedia Geográfica de Bolivia. La Paz.
- MÖLLER A., WIEGAND P., GRUSCHOW C., SEUCHTER S.A., BAUR M.P., BRINKMANN B. 1994. Population data and forensic efficiency values for the STR systems HUMVWA, HUMMBP and HUMFABP. Int. J. Legal Med. 106:183-189.
- MORAGA M.L., ROCCO P., MIQUEL J.F., NERVI F., LLOP E., CHAKRABORTY R., ROTHAMMER F., CARVALLO P. 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., ASPILLAGA E., SANTORO C., STANDEN V., CARBALLO P., ROTHAMMER F. 2001. mtDNA análisis of mummies from northern Chile endorse the hypothesis of an Amazonian origin of Andean populations. Revista Chilena de Historia Natural. 74(3):719-726.
- MOSELEY M. 1993. The Incas and their ancestors: the archaeology of Peru. London: Thames and Hudson.
- MONTOYA J., OJALA D., ATTARDI G. 1981. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNA's. Nature. 290:465-470.
- MULLIS K.B., FALOONA F., SCHAARF S.J., SAIKI R.K., HORN G.T., ERLICH H.A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor. Sym. Quant. Biol. 51:263-270.
- MULLIS K.B., FALOONA F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro polymerase catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 155:335-350.
- MURRA J.V. 2002. El Mundo Andino, población, medio ambiente y economía. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist. 106:283-292.
- NEI M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press.

- NELLEMANN L.J., MØLLER A., MORLING N. 1994. PCR typing of DNA fragments of the short tandem repeat (STR) system HUMTH01 in Danes and Greenland Eskimos. *Forensic Sci. Int.* 68(1):45-51.
- NEVES E.G. 1999. Changing perspectives in Amazonian archaeology. En *Archaeology in Latin America*. Ed. G. Politis & B. Alberti. London: Routledge.
- NICHOLS J. 2000. Estimating dates of early American colonization events. En *Time Depth in Historical Linguistics*. Vol. 2. Ed. C. Renfrew, A. McMahon & L.Trask. Pp.643-654. Cambridge. The McDonald Institute for Archaeological Research.
- NOBLE G.K. 1965. *Proto-Arawakan and its Descendants* (The Hague: Mouton and Co./University of Indiana).
- NORDENSKJOLD E. 1922. *Indianer und weisse in nordostbolivien*. Stuttgart: Verlegt Von Strecker und Schoeder.
- NÚÑEZ L., DILLEHAY T.D. 1995. *Movilidad giratoria, armonía social y desarrollo en los Andes meridionales: patrones de tráfico e interacción económica (ensayo)*. 2ª Ed. Antofagasta, Chile.
- OLSON J.S. 1991. *The indians of Central and South America: An Ethnohistorical Dictionary*. Greenwood Press, New York.
- OTTAVIANO J., OTTAVIANO I. 1980. *Notas sobre la cultura tacana*. La Paz: ILV.
- O'ROURKE D.H., MOBARRY A., SUAREZ B.K. 1992. Patterns of genetic variation in Native America. *Hum. Biol.* 64:417-434.
- PAGE R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.
- PALHA T.J., RODRIGUES E.M., DOS SANTOS S.E. 2010. Y-S TR haplotypes of Native American populations from the Brazilian Amazon region. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4(5):121-123.
- PARSON T.J., MUNIEC D.S., SULLIVAM K., WOODYAT N., ALLISTON-GREINER R., WILSON M.R., BERRY D.L., HOLLAND K.A., WEEDN V.W., GILL P., HOLLAND M.M. 1997. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature Genetics*. 15:363-368.

- PÄRSSINEN M., SIIRIÄINEN A. 1997. Inka-style ceramics and their chronological relationship to the Inka expansion in the southern lake Titicaca area. *Latin American Antiquity*. 8(3):255-271.
- PÉREZ-LEZAUN A., CALAFELL F., CLARIMÓN J., BOSCH E., MATEU E., GUSMÃO L., AMORIM A., BENCHEMSI N., BERTRANPETIT J. 2000. Allele frequencies of 13 short tandem repeats in population samples from the Iberian Peninsula and Northern Africa. *Int. J. Legal Med.* 113:208-214.
- PETERSEN J.B., NEVES E., HECKENBERGER M. 2001. Gift from the past: Terra preta and prehistoric Amerindian occupation in Amazonia. En: *Unknown Amazon: Culture in nature in ancient Brazil*. Edited by C. McEwan, C. Barreto & E. Neves. Pp.86-105. London: The British Museum Press.
- PIKO L, MATSUMOTO L. 1976. Number of mitochondria and some properties of mitochondria DNA in the mouse egg. *Dev. Biol.* 49(1):1-10.
- PRAGER E.M., WILSON A.C. 1978. Construction of phylogenetic trees for proteins and nucleic acids: empirical evaluation of alternative matrix methods. *J. Mol. Evol.* 11(2):129-142.
- RAHMAN Z., AFROZE T., WEIR B.S. 2001. DNA typing results from two urban subpopulations of Pakistan. *J. Forensic Sci.* 46(1):111-115.
- RAYMOND M., ROUSSET F. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*. 86(3):248-249.
- RIBERA L. DE s/f. Moxos. Descripciones exactas e historia fiel de los indios, animales y plantas de la provincia de Moxos en el Virreinato del Perú 1786-1794, y los siguientes estudios. En: Palau, Mercedes y Sáiz, Blanca. *Las reducciones jesuíticas de Moxos y el gobernador Lázaro de Ribera y Estudio documental. Los informes del gobernador de Moxos Lázaro de Ribera. El viso.*
- RICKARDS O., MARTINEZ-LABARGA C., LUM J.K., DE STEFANO G.F., CANN R.L. 1999. mtDNA history of the Cayapa Amerinds of Ecuador: detection of additional founding lineages for the Native American populations. *Am. J. Hum. Genet.* 65(2):519-530.

- RIESTER J. 1993. Universo Mítico de los Chimane. Pueblos Indígenas de las Tierras Bajas de Bolivia. La Paz, Bolivia.
- RIVERO W. 1994. Relaciones entre la sociedad chacobo y la "sociedad nacional". Textos antropológicos, 7. La Paz: UMSA.
- REDD A.J., TAKEZAKI N., SHERRY S.T., MCGARVEY S.T., SOFRO A.S., STONEKING M. 1995. Evolutionary history of the COII/tRNA^{Lys} intergenic 9 base pair deletion in human mitochondrial DNAs from the Pacific. *Mol. Biol. Evol.* 12(4):604-615.
- REYNOLDS J., WEIR B.S., COCKERHAM C.C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short term genetic distance. *Genetics.* 105:767-779.
- ROBIN E.D., WONG R. 1988. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* 136:507-513.
- ROCABADO O., PENACINO G., SALA A., REVOLLO S., MARINO M., POLISECKI E. 2003. Análisis genético poblacional de 9 Y-STRs en un grupo étnico de Bolivia. *Biofarbo.* XI:49-52.
- ROCCO P., MORALES G., MORAGA M., MIQUEL J.F., NERVI F., LLOP E., CARVALLO P., ROTHAMMER F. 2002. Composición genética de la población Chilena. Distribución de polimorfismos de DNA mitocondrial en grupos originarios y en la población mixta de Santiago. *Rev. médica Chile.* 130(2).
- ROEWER L., KRAWCZAK M., WILLUWEIT S., NAGY M., ALVES C., AMORIM A., ANSLINGER K., AUGUSTIN C., BETZ A., BOSCH E., CAGLIÁ A., CARRACEDO A., CORACH D., DEKAIRELLE A.F., DOBOSZ T., DUPUY B.M., FÜREDI S., GEHRIG C., GUSMAÕ L., HENKE J., HENKE L., HIDDING M., HOHOFF C., HOSTE B., JOBLING M.A., KÄRGEL H.J., DE KNIJFF P., LESSIG R., LIEBEHERR E., LORENTE M., MARTÍNEZ-JARRETA B., NIEVAS P., NOWAK M., PARSON W., PASCALI V.L., PENACINO G., PLOSKI R., ROLF B., SALA A., SCHMIDT U., SCHMITT C., SCHNEIDER P.M., SZIBOR R., TEIFEL-GREDING J., KAYSER M. 2001. Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Sci. Int.* 118(2-3):106-113.

- ROGERS A.R., HARPEDING H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9(3):552-569.
- ROMERO H. (coord.) 1991. Pueblos y territorios indígenas del Oriente de Bolivia. Apoyo a la formulación de políticas para las poblaciones indígenas del trópico de Bolivia: situación de las comunidades siriono y tacana, el Bosque Chimanes y el Parque Isiboro Sécore. La Paz: MACA - OIT.
- ROOTSI S., ZHIVOTOVSKY L.A., BALDOVIC M., KAYSER M., KUTUEV I.A., KHUSAINOVA R., BERMISHEVA M.A., GUBINA M., FEDOROVA S.A., ILUMÄE A.M., KHUSNUTDINOVA E.K., VOEVODA M.I., OSIPOVA L.P., STONEKING M., LIN A.A., FERA K V., PARIK J., KIVISILD T., UNDERHILL P.A., VILLEMS R. 2007. A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 15(2):204-211.
- ROSTEDT I., LALU K., LUKKA M., SAJANTILA A. 1996. Genotyping of five short tandem repeat loci via triplex and duplex PCR. *Forens. Sci. Int.* 82(3):217-226.
- ROTHHAMMER F., LLOP E., CARVALLO P., MORAGA M. 2001. Origin and evolutionary relationships of native Andean populations. *High Altitude Medicine & Biology.* 2(2):227-233.
- ROTHHAMMER F., MORAGA M., RIVERA M., CALOGERO M., STANDEM V., GARCÍA F., CARVALLO P. 2003. Análisis del ADNmt de restos esqueléticos del sitio arqueológico de Tiwanaku y su relación con el origen de sus constructores. *Chungara, Revista de Antropología Chilena* 35(2):269-274
- ROZEN S., SKALETSKY H., MARSZALEK J.D., MINX P.J., CORDUM H.S., WATERSTON R.H., WILSON R.K., PAGE D.C. 2003. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature.* 423(6942):873-876.
- RUANO G., PAGLIARO E.M., SCHWARTZ T.R., LARNY K., MESSINA D., GAENSSIEN R.E., LEE H.C. 1992. Heat-soaked PCR: an efficient method for DNA amplification with applications to forensic analysis. *Biotechniques* 13(2):266-274.
- RUHLEN M. 1991. *A Guide to the World's Languages.* Stanford: University Press.

- SAIKI R.K., SCHARFT F., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230(4732):1350-1354.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S., HIGUCHI R.H., HORN G.T., MULLIS G.B., ERLICH H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- SAIGNES T. 1985. Los Andes orientales: historia de un olvido. *Estudios Históricos*, No. 2. Cochabamba.
- SAIGNES T. 1985. Caciques, tribute and migration in the Southern Andes. Indian society at the 17th. century colonial order (Audiencia de Charcas). London University: Inst. of Latin American Studies.
- SAILLARD J., MAGALHAES P.J., SCHWARTZ M., ROSENBERG T., NORBY S. 2000. Mitochondrial DNA variant 11719G is a marker for the mtDNA haplogroup cluster HV. *Hum. Biol.* 72(6):1065-1068.
- SAITOU N., NEI M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4):406-425.
- SAKEL J. 2004. A grammar of the Mosestén, series Mouton Grammar Library 33. New York: Mouton de Gruyter.
- SALA A., PENACINO G., CORACH D. 1998. Comparison of allele frequencies of eight STR loci from Argentinian Amerindian and European populations. *Hum. Biol.* 70(5):937-947.
- SÁNCHEZ W. 2008. Inkas, “flecheros” y mitmaquna. Cambio social y paisajes culturales en los Valles y en los Yungas de Inkachaca/Paracti y Tablas Monte (Cochabamba-Bolivia, siglos XV-XVI). Uppsala University.
- SANTOS M., WARD R.H., BARRANTES R. 1994. MtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Human Biology*. 66(6):963-977.
- SANTOS S.E.B., RIBEIRO DOS-SANTOS A.K.C., MEYER D., ZAGO M.A. 1996. Multiple founder haplotypes of mitochondrial DNA in Amerindian revealed by RFLP and sequencing. *An. Hum. Genet.* 60(4):305-319.

- SALZANO F.M., CALLEGARI-JACQUES S.M. 1988. South American Indians: A case study in evolution. En: GA Harrison. Research monographs on human population biology. Oxford: Clarendon Press.
- SAUL J., FONDEVILA M., SALAS A., BRIÓN M., LAREU M.V., CARRACEDO A. 2004. Y-chromosome STR-haplotype typing in El Salvador. *Forensic Sci. Int.* 142(1):45-49.
- SCHMITT R., BONATTO S.L., FREITAS L.B., MUSCHNER V.C., HILL K., HURTADO A.M., SALZANO F.M. 2004. Extremely limited mitochondrial DNA variability among the Ache Natives of Paraguay. *Ann. Hum. Biol.* 31(1):87-94.
- SCHNEIDER S., ROESSLI D., EXCOFFIER L. 2000. Arlequin (ver. 2000): A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SCHURR T.G., BALLINGER S.W., GAN Y.Y., HODGE J.A., MERRIWETHER D.A., LAWRENCE D.N., KNOWLER W.C., WEISS K.M., WALLACE D.C. 1990. Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 46(3):613-623.
- SCHURR T.G., SHERRY S.T. 2004. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *Am. J. Hum. Biol.* 16(4):420-439.
- SHOEMAKER J., SHOEMAKER N, ARNOLD D. 1975. Migraciones de los Essequias. Riberalta: ILV.
- SILVA W.A., BONATTO S.L., HOLANDA A.J., RIBEIRO-DOS-SANTOS A.K., PAIXAO B.M., GOLDMAN G.H., ABE-SANDES K., RODRIGUEZ-DELFIN L., BARBOSA M., PAÇÓ-LARSON M.L., PETZL-ERLER M.L., VALENTE SANTOS S.E.B., ZAGO M.A. 2002. Mitochondrial genome diversity of Native Americans supports a single early entry of founder populations into America. *Am. J. Hum. Genet.* 71(1):187-192.
- SILVER H. 1982. Probability of inclusion in paternity testing. American Association of Blood Banks, Arlington.

- SKALETSKY H., KURODA-KAWAGUCHI T., MINX P.J., CORDUM H.S., HILLIER L., BROWN L.G., REPPING S., PYNTIKOVA T., ALI J., BIERI T., CHINWALLA A., DELEHAUNTY A., DELEHAUNTY K., DU H., FEWELL G., FULTON L., FULTON R., GRAVES T., HOU S.F., LATRIELLE P., LEONARD S., MARDIS E., MAUPIN R., MCPHERSON J., MINER T., NASH W., NGUYEN C., OZERSKY P., PEPIN K., ROCK S., ROHLFING T., SCOTT K., SCHULTZ B., STRONG C., TIN-WOLLAM A., YANG S.P., WATERSTON R.H., WILSON R.K., ROZEN S., PAGE D.C. 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423(6942):825-837.
- SNEATH P.H.A., SOKAL R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. WH Freeman. San Francisco.
- STANISH C. 2001. The origin of state societies in South America. *Annu. Rev. Anthropol.* 30:41-64.
- STEWART J. 1944-1949. *Handbook of South American Indians*. 7 vols. Bureau of American Ethnology Bulletin No. 143. Washington, D.C. Smithsonian Institution.
- STONE A.C., STONEKING M. 1998. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *Am. J. Hum. Genet.* 62(5):1153-1170.
- STONEKING M., JORDE L.B., BHATIA K., WILSON A.C. 1990. Geographic variation in human mitochondrial DNA from Papua New Guinea. *Genetics.* 124(3):717-733.
- SU B., XIAO C., DEKA R., SEIELSTAD M.T., KANGWANPONG D., XIAO J., LU D., UNDERHILL P., CAVALLI-SFORZA L., CHAKRABORTY R., JIN L. 2000. Y chromosome haplotypes reveal prehistorical migrations to the Himalayas. *Hum. Genet.* 107(6):582-590.
- SYKES B., LEIBOFF A., LOW-BEER J., TETZNER S., RICHARDS M. 1995. The origins of the Polynesians: an interpretation from mitochondrial lineage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 57(6):1463-1475.
- TAJIMA F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 123:585-595.

- TAJIMA F. 1993. Measurement of DNA polymorphism En: Mechanisms of Molecular Evolution: Introduction to Molecular Paleopopulation Biology. Takahata N., Clark A.G. Eds. Tokyo, Sunderland. M.A. Japan Scientific Societies Press, Sianuer Associates Inc. Pp.37-59.
- TARAZONA-SANTOS E., CARVALHO-SILVA D.R., PETTENER D., LUISELLI D., DE STEFANO G.F., LABARGA C.M., RICKARDS O., TYLER-SMITH C., PENA S.D., SANTOS F.R. 2001. Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity: evidence from the Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 68(6):1485-1496.
- TORRONI A., SCHURR T.G., YANG C.C., SZATHMARY E.J., WILLIAMS R.C., SCHANFIELD M.S., TROUP G.A., KNOWLER W.C., LAWRENCE D.N., WEISS K.M., WALLACE D.C. 1992. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics.* 130:153-162.
- TORRONI A., NEEL J.V., BARRANTES R., SCHURR T.G., WALLACE D.C. 1994. Mitochondrial DNA "clock" for the Amerinds and its implications for timing entry into North America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(3):1158-1162.
- TORRONI A., SCHURR T.G., CABELL M.F., BROWN M.D., NEEL J.V., LARSEN M., SCHANFIELD M.S., SMITH D.G., VULLO C.M., WALLACE D.C. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.* 53(3):563-590.
- TOURRET N., LÓPEZ GAMELO J., VIDAL-RIOJA L. 1999. Allele frequencies of six STR loci in Argentine populations. *J. Forensic Sci.* 44(6):1265-1269.
- Trejaut J.A., Kivisild T., Loo J.H., Lee C.L., He C.L., Hsu C.J., Lee Z.Y., Lin M. 2005. Traces of archaic mitochondrial lineages persist in Austronesian-speaking Formosan populations. *PLoS Biol.* 3(8):e247.
- UNDERHILL P.A., JIN L., LIN A.A., MEHDI S.Q., JENKINS T., VOLLRATH D., DAVIS R.W., CAVALLI-SFORZA L.L., OEFNER P.J. 1997. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* 7(10):996-1005.

VAN DEN BERG H., SCHIFFERS N. 1992. La cosmovisión Aymara. Hisbol eds. University of Texas.

VARGAS UGARTE R.S.J. 1964. Historia de la Compañía de Jesús en el Perú. Burgos.

VENTER J.C., ADAMS M.D., MYERS E.W., LI P.W., MURAL R.J., SUTTON G.G., SMITH H.O., YANDELL M., EVANS C.A., HOLT R.A., GOCAYNE J.D., AMANATIDES P., BALLEW R.M., HUSON D.H., WORTMAN J.R., ZHANG Q., KODIRA C.D., ZHENG X.H., CHEN L., SKUPSKI M., SUBRAMANIAN G., THOMAS P.D., ZHANG J., GABOR MIKLOS G.L., NELSON C., BRODER S., CLARK A.G., NADEAU J., MCKUSICK V.A., ZINDER N., LEVINE A.J., ROBERTS R.J., SIMON M., SLAYMAN C., HUNKAPILLER M., BOLANOS R., DELCHER A., DEW I., FASULO D., FLANIGAN M., FLOREA L., HALPERN A., HANNENHALLI S., KRAVITZ S., LEVY S., MOBARRY C., REINERT K., REMINGTON K., ABU-THREIDEH J., BEASLEY E., BIDDICK K., BONAZZI V., BRANDON R., CARGILL M., CHANDRAMOULISWARAN I., CHARLAB R., CHATURVEDI K., DENG Z., DI FRANCESCO V., DUNN P., EILBECK K., EVANGELISTA C., GABRIELIAN A.E., GAN W., GE W., GONG F., GU Z., GUAN P., HEIMAN T.J., HIGGINS M.E., JI R.R., KE Z., KETCHUM K.A., LAI Z., LEI Y., LI Z., LI J., LIANG Y., LIN X., LU F., MERKULOV G.V., MILSHINA N., MOORE H.M., NAIK A.K., NARAYAN V.A., NEELAM B., NUSSKERN D., RUSCH D.B., SALZBERG S., SHAO W., SHUE B., SUN J., WANG Z., WANG A., WANG X., WANG J., WEI M., WIDES R., XIAO C., YAN C., YAO A., YE J., ZHAN M., ZHANG W., ZHANG H., ZHAO Q., ZHENG L., ZHONG F., ZHONG W., ZHU S., ZHAO S., GILBERT D., BAUMHUETER S., SPIER G., CARTER C., CRAVCHIK A., WOODAGE T., ALI F., AN H., AWE A., BALDWIN D., BADEN H., BARNSTEAD M., BARROW I., BEESON K., BUSAM D., CARVER A., CENTER A., CHENG M.L., CURRY L., DANAHER S., DAVENPORT L., DESILETS R., DIETZ S., DODSON K., DOUP L., FERRIERA S., GARG N., GLUECKSMANN A., HART B., HAYNES J., HAYNES C., HEINER C., HLADUN S., HOSTIN D., HOUCK J., HOWLAND T., IBEGWAM C., JOHNSON J., KALUSH F., KLINE L., KODURU S., LOVE A., MANN F., MAY D., MCCAWLEY S., MCINTOSH T., MCMULLEN I., MOY M., MOY L., MURPHY B., NELSON K., PFANNKOCH C., PRATTS E., PURI V., QURESHI H.,

REARDON M., RODRIGUEZ R., ROGERS Y.H., ROMBLAD D., RUHFEL B., SCOTT R., SITTER C., SMALLWOOD M., STEWART E., STRONG R., SUH E., THOMAS R., TINT N.N., TSE S., VECH C., WANG G., WETTER J., WILLIAMS S., WILLIAMS M., WINDSOR S., WINN-DEEN E., WOLFE K., ZAVERI J., ZAVERI K., ABRIL J.F., GUIGÓ R., CAMPBELL M.J., SJOLANDER K.V., KARLAK B., KEJARIWAL A., MI H., LAZAREVA B., HATTON T., NARECHANIA A., DIEMER K., MURUGANUJAN A., GUO N., SATO S., BAFNA V., ISTRAIL S., LIPPERT R., SCHWARTZ R., WALENZ B., YOOSEPH S., ALLEN D., BASU A., BAXENDALE J., BLICK L., CAMINHA M., CARNES-STINE J., CAULK P., CHIANG Y.H., COYNE M., DAHLKE C., MAYS A., DOMBROSKI M., DONNELLY M., ELY D., ESPARHAM S., FOSLER C., GIRE H., GLANOWSKI S., GLASSER K., GLODEK A., GOROKHOV M., GRAHAM K., GROPMAN B., HARRIS M., HEIL J., HENDERSON S., HOOVER J., JENNINGS D., JORDAN C., JORDAN J., KASHA J., KAGAN L., KRAFT C., LEVITSKY A., LEWIS M., LIU X., LOPEZ J., MA D., MAJOROS W., MCDANIEL J., MURPHY S., NEWMAN M., NGUYEN T., NGUYEN N., NODELL M., PAN S., PECK J., PETERSON M., ROWE W., SANDERS R., SCOTT J., SIMPSON M., SMITH T., SPRAGUE A., STOCKWELL T., TURNER R., VENTER E., WANG M., WEN M., WU D., WU M., XIA A., ZANDIEH A., ZHU X. 2001. The sequence of the human genome. *Science*. 291(5507):1304-1351.

VERMA R.S., RODRIGUEZ J., DOSIK H. 1982. The clinical significance of pericentric inversion of the human Y chromosome: a rare "third" type of heteromorphism. *J. Hered.* 73(3):236-238.

WALLACE D.C. 1982. Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol. Rev.* 46:208-240.

WALLACE D.C. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8739-8746.

WALSH P.S., METZGER D.A., HIGUCHI R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4):506-513.

- WARD R.H., SALZANO F.M., BONATTO S.L., HUTZ M.H., COIMBRA C.E.A.JR., SANTOS R.V. 1996. Mitochondrial DNA polymorphism in three Brazilian Indian tribes. *American Journal of Human Biology*. 8(3):317-323.
- WATSON E., FORSTER P., RICHARDS M., BANDELT H-J. 1997. Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am. J. Hum. Genet.* 61(3):691–704.
- WEIR, B.S. 1990. *Intraspecific differentiation*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Assoc..
- WENTZEL S. 1989. Tacana and highland migrant land use, living conditions and local organizations in the Bolivian Amazon. University of Florida (tesis).
- WELLS R.S., YULDASHEVA N., RUZIBAKIEV R., UNDERHILL P.A., EVSEEVA I., BLUE-SMITH J., JIN L., SU B., PITCHAPPAN R., SHANMUGALAKSHMI S., BALAKRISHNAN K., READ M., PEARSON N.M., ZERJAL T., WEBSTER M.T., ZHOLOSHVILI I., JAMARJASHVILI E., GAMBAROV S., NIKBIN B., DOSTIEV A., AKNAZAROV O., ZALLOUA P., TSOY I., KITAEV M., MIRRAKHIMOV M., CHARIEV A., BODMER W.F. 2001. The Eurasian heartland: a continental perspective on Y-chromosome diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(18):10244-10249.
- WIEGAND P., BUDOWLE B., RAND S., BRINKMANN B. 1993. Forensic validation of the STR systems SE33 and TC11. *Int. J. Legal Med.* 105:315-320
- WRISCHNIK L.A., HIGUCHI M., STONEKING M., ERLICH H.A., ARNHEIM N., WILSON A.C. 1987. Length mutations in human mitochondrial DNA: Direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Nucleic Acids Res.* 15(2):529-541.
- XIAODONG X., XUNLING W., XIAOLIN H., GUIFANG R., XIAOLIN L. 2001. Tibetan population data on the PCR-typed loci D16S539, D7S820, D13S317, HUMF13A01, FESFPS, vWA, HUMTH01, TPOX and CSF1PO. *Int. J. Legal Med.* 114(6):349-351.
- Y Chromosome Consortium. varios autores. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 2002 ;12(2):339-48.
- YUNIS J.J., ACEVEDO L.E., CAMPO D.S., YUNIS E.J. 2005. Population data of Y-STR minimal haplotypes in a sample of Caucasian-Mestizo and African descent individuals of Colombia. *Forensic Sci. Int.* 151(2-3):307-313.

ZEITUM LÓPEZ S. 1991. Amazonia Boliviana. Introducción al estudio de la temática
Norteamazónica. Ed. Progravi. La Paz, Bolivia.