

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**Composición genética de poblaciones históricas
y prehistóricas humanas de las Islas Canarias**

Autor: Maca Meyer, Nicole

**Directores: José María Larruga Riera
y Matilde Arnay de la Rosa**

Departamento de Parasitología, Ecología y Genética

Dr. JOSÉ MARÍA LARRUGA RIERA, PROFESOR TITULAR DE GENÉTICA DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA, CON DNI N° 41981334-D

Dra. MATILDE ARNAY DE LA ROSA, PROFESORA TITULAR DE PREHISTORIA DE LA FACULTAD DE GEOGRAFÍA E HISTORIA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA, CON DNI N° 42006735-H

CERTIFICAN:

Que Nicole Maca Meyer, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su co-dirección el trabajo titulado “Composición genética de poblaciones históricas y prehistóricas humanas de las Islas Canarias”, el cual reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral.

Fdo. Dr. José María Larruga Riera

Fdo. Dra. Matilde Arnay de la Rosa

La Laguna, Diciembre de 2002

Este trabajo ha sido realizado gracias al Ministerio de Ciencia y Tecnología, por la financiación del proyecto de investigación “*Evolución genética de las poblaciones canarias: de la prehistoria a la actualidad*” (BMC2001-3511), y a la concesión, por parte de la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias, de una beca de Postgrado para la realización de esta Tesis Doctoral, de la cual me he beneficiado entre los años 1999-2002.

Quisiera agradecer a todos los miembros del Área de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna que me han apoyado durante los años de realización de este trabajo.

A Carlos y Mari por su inestimable compañerismo y amistad.

A mis niños/as Cabo, Domingo, Juan, Juanma, Miguel, Miguel I, Raquel y William por ayudarme a desconectar.

A Anna, David, Oscar y Paula por demostrarme su amistad aun en la distancia y por esos correos tan divertidos.

Al Dr. J. Bertranpetit por su apoyo.

Al Dr. J.F. Navarro, al Museo Arqueológico de La Gomera y al Cabildo de la Gomera por la obtención de los dientes aborígenes de La Gomera.

Al Dr. J. Velasco por la obtención de los dientes aborígenes de El Hierro.

Al Instituto Cabrera Pinto, en especial a A. García, por la obtención de los dientes de Tegueste; a M.J. Lugo por los de Güímar y a B. Galván por los de Buenavista.

A la Dra. M. Arnay por facilitarme las muestras de La Concepción y al Dr. C. Hernández, por las muestras de San Blas.

Al Dr. J. Pestano por acogerme en su laboratorio.

Por último me gustaría agradecer a toda esa gente que se ha interesado en algún momento por mí y por este trabajo.

A mi familia

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. POBLAMIENTO PREHISTÓRICO.....	2
1.1. Origen de los primeros pobladores de las Islas.....	3
1.2. ¿Cuándo llegaron?.....	3
1.3. Causas y medios del poblamiento.....	4
2. CONQUISTA Y COLONIZACIÓN.....	4
2.1. El Predescubrimiento.....	4
2.2. La Conquista.....	5
2.3. La Colonización.....	7
3. STA. CRUZ DE TENERIFE.....	8
3.1. La Iglesia de la Concepción.....	10
4. ESTUDIOS GENÉTICOS PREVIOS SOBRE LA POBLACIÓN	
CANARIA.....	10
4.1. Marcadores autosómicos.....	10
4.2. El ADN mitocondrial.....	11
4.3. Cromosoma Y.....	12
5. ESTUDIOS DE ADN ANTIGUO.....	13
5.1. Degradación post-mortem del ADN.....	13
5.2. Recuperación de ADN antiguo.....	14
6. OBJETIVOS.....	16
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
1. MUESTRAS.....	19
1.1. Muestras de población histórica.....	19
1.2. Muestras de población aborigen.....	21
2. LIMPIEZA DE LAS MUESTRAS.....	23
3. EXTRACCIÓN DEL ADN.....	24
4. ESTUDIO DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE I (RHVI) DEL ADN	
MITOCONDRIAL.....	25
4.1. Amplificación al azar con cebadores degenerados.....	27
4.2. Purificación de los productos de amplificación.....	28
4.3. Clonaje de los productos de amplificación.....	29
4.3.1. Reacción de ligado del pGEM-T [?] con el producto	
de PCR.....	29
4.3.2. Transformación de células JM109 con las reacciones	

de ligado.....	29
4.3.3. Selección de colonias con inserto.....	30
4.3.4. Extracción de plásmidos.....	30
4.4. Secuenciación de productos amplificados y clones.....	31
4.4.1. Reacción de marcado de cebadores.....	31
4.4.2. Reacciones de extensión y terminación.....	32
4.4.3. Electroforesis de los productos de secuenciación.....	33
5. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE RESTRICCIÓN DEL	
ADNmt.....	34
5.1. Polimorfismo <i>AluI</i> 7025.....	35
5.2. Polimorfismo <i>HinfI</i> 12308.....	36
5.3. Polimorfismo <i>HpaI</i> 3592.....	37
5.4. Polimorfismo <i>NlaIII</i> 4216.....	38
6. DETERMINACIÓN DEL SEXO DE LOS INDIVIDUOS.....	39
7. PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN.....	41
7.1. Área de trabajo y material.....	42
7.2. Controles.....	43
7.3. Comportamiento molecular apropiado.....	43
7.4. Reproducibilidad.....	44
7.5. Clonaje.....	44
8. FILOGENIA DE LOS LINAJES U6.....	44
8.1. Análisis de la RHVI de linajes U6.....	44
8.2. Análisis de linajes completos del U6.....	46
8.2.1. Análisis de restricción de los linajes U6.....	46
<i>Polimorfismo MboI</i> 2349.....	47
<i>Polimorfismo MboI</i> 3348.....	48
8.2.2. Amplificación y secuenciación completa del ADNmt.....	49
<i>Precipitación con Polietilenglicol (PEG)</i>	51
9. PROGRAMAS Y ESTADÍSTICOS UTILIZADOS.....	51
9.1. Análisis de la RHVI en muestras históricas y prehistóricas..	51
9.1.1. Test de Diferenciación.....	52
9.1.2. Diversidad.....	52
9.1.3. Estimaciones de mezcla.....	52
<i>Programa ADMIX 2.0</i>	53

<i>Programa ADMIX.PAS</i>	53
<i>Haplogrupos</i>	53
<i>Identidad</i>	54
9.2. Análisis de los linajes del U6	54
9.2.1. Filogenia de los linajes U6	54
9.2.2. Cálculo de la diversidad nucleotídica (?)	55
9.2.3. Cálculo de las edades de haplogrupos	55
<i>RHVI</i>	55
<i>Secuencias Completas</i>	55
9.2.4. Migración de los linajes U6	56
III. RESULTADOS	57
1. EFICIENCIAS DE EXTRACCIÓN	58
1.1. Eficiencia de amplificación de la RHVI del ADNmt	58
1.2. Eficiencias de los polimorfismos de restricción y amelogenina	60
2. POBLACIÓN HISTÓRICA	61
2.1. Frecuencia de haplogrupos	61
2.2. Análisis de secuencias compartidas	63
2.2.1. Secuencias únicas	67
2.2.2. Secuencias Americanas	67
2.2.3. Secuencias Africanas	68
2.2.4. Secuencias Norteafricanas	68
2.2.5. Secuencias específicas Canarias	68
2.2.6. Secuencias Europeas	69
<i>Haplogrupo H</i>	69
<i>Haplogrupo V*</i>	69
<i>Haplogrupo HVR</i>	70
<i>Haplogrupos J* y J1</i>	70
<i>Haplogrupos T*, T2, T3 y T5</i>	70
<i>Haplogrupos I, W y X</i>	70
<i>Haplogrupos U3, U5a*, U5a1 y U5b</i>	71
<i>Haplogrupo K</i>	71
2.2.7. Diversidad de la población del siglo XVIII	71
2.2.8. Pervivencia y posible origen de los linajes históricos	

de Santa Cruz.....	71
2.3. Estimaciones de mezcla para la población histórica.....	72
2.3.1. Estadístico mY.....	72
2.3.2. Estadístico mL.....	73
2.3.3. Haplogrupos-1.....	74
2.3.4. Haplogrupos-2.....	74
2.3.5. Identidad.....	74
3. POBLACIÓN ABORIGEN.....	75
3.1. Frecuencia de haplogrupos.....	75
3.2. Análisis de secuencias compartidas.....	77
3.2.1. Secuencias únicas.....	77
3.2.2. Secuencias Africanas.....	80
3.2.3. Secuencias Norteafricanas.....	80
3.2.4. Secuencias específicas Canarias.....	81
3.2.5. Secuencias Europeas.....	81
<i>Haplogrupo H</i>	81
<i>Haplogrupo V*</i>	82
<i>Haplogrupo HVR</i>	82
<i>Haplogrupo J*</i>	82
<i>Haplogrupo T3</i>	83
<i>Haplogrupos U* y U7</i>	83
<i>Haplogrupo K</i>	83
<i>Haplogrupo N1b</i>	84
3.2.6. Diversidad de la población aborigen.....	84
3.2.7. Pervivencia y posible origen de las secuencias aborígenes.....	84
3.3. Estimaciones de mezcla.....	85
3.3.1. Estadístico mY.....	85
3.3.2. Estadístico mL.....	85
3.3.3. Haplogrupos-1.....	86
3.3.4. Haplogrupos-2.....	87
3.3.5. Identidad.....	87
4. FILOGENIA DE LOS LINAJES DEL U6.....	88
4.1. Filogenia de los linajes U6 basada en secuencias	

de la RHVI.....	88
4.1.1. Edades de Coalescencia basadas en sustituciones	
de la RHVI.....	90
4.1.2. Diversidad nucleotídica.....	91
4.2. Estudio de linajes completos del U6.....	91
4.2.1. Cálculo de edades.....	91
IV. DISCUSIÓN.....	94
1. METODOLOGÍA.....	95
1.1. Elección de las muestras.....	95
1.2. Elección del protocolo de extracción.....	96
1.3. Eficiencias de extracción y amplificación.....	96
1.4. Contaminaciones.....	97
1.5. Criterios de autenticidad.....	98
<i>Área de trabajo físicamente separada.....</i>	98
<i>Controles.....</i>	99
<i>Comportamiento molecular apropiado.....</i>	99
<i>Reproducibilidad.....</i>	100
<i>Clonaje.....</i>	100
<i>Replicación independiente.....</i>	101
<i>Preservación bioquímica.....</i>	101
<i>Cuantificación.....</i>	102
<i>Restos asociados.....</i>	102
2. LA POBLACIÓN HISTÓRICA DE SANTA CRUZ DE TENERIFE.....	103
2.1. Libros de defunciones.....	104
2.2. Partidas de casamientos.....	105
2.3. Concordancia con los datos genéticos obtenidos.....	106
3. LOS ABORÍGENES.....	108
4. ESTIMAS DE MEZCLA.....	109
4.1. Estimaciones obtenidas a partir de marcadores autosómicos.....	110
4.2. Estimaciones obtenidas a partir del cromosoma Y.....	111
4.3. Estimaciones obtenidas a partir del ADNmt.....	111
4.4. Concordancia entre las estimaciones de mezcla y la historia de	
las Islas Canarias.....	113
5. SUB-HAPLOGRUPO U6.....	114

5.1. Filogenia obtenida a partir de la RHVI.....	114
<i>Edad del sub-haplogrupo U6.....</i>	<i>115</i>
5.2. Filogenia obtenida a partir de las secuencias completas.....	116
<i>Edad del sub-haplogrupo U6.....</i>	<i>116</i>
5.3. Origen y dispersión del sub-haplogrupo U6.....	117
5.4. El sub-haplogrupo U6 en la Península Ibérica.....	118
6. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE ESTE TRABAJO.....	119
V. CONCLUSIONES.....	123
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	126
VII. APÉNDICES.....	148
APÉNDICE-1.....	149
APÉNDICE-2.....	157

I. INTRODUCCIÓN

Desde la perspectiva humana, no hay evolución más interesante que la de nuestra propia especie y, desde tiempos inmemorables, la pregunta sobre nuestro origen e historia siempre ha estado presente. A la información obtenida por antropólogos, arqueólogos y lingüistas hay que sumarle, ahora, los datos obtenidos en el ámbito molecular. En este campo, los avances han sido espectaculares en los últimos años. Desde los estudios con grupos sanguíneos y polimorfismos enzimáticos en los años 50 a 80, se pasó a los del ADN, más discriminativos que los anteriores, para darnos información sobre nuestra evolución, demografía y movimientos. Estos estudios se han centrado en marcadores biparentales (localizados en los autosomas) y en los uniparentales (ADN mitocondrial y cromosoma Y). Estos últimos han cobrado mucha fuerza por su forma de herencia (vía materna y paterna, respectivamente) y por no sufrir recombinación. Sin embargo, probablemente el mayor avance se ha producido con la posibilidad de obtener ADN de muestras post-mortem, importante no sólo para uso forense, sino porque ofrece la posibilidad de retroceder en el tiempo y estudiar organismos, en algunos casos extintos, y la composición genética de diversas poblaciones antiguas.

Estas técnicas se han aplicado, en este trabajo, para el estudio de muestras arqueológicas provenientes de las Islas Canarias para que, junto con los datos obtenidos de los trabajos antropológicos, arqueológicos y moleculares realizados hasta el momento, se pueda llegar a una visión completa sobre el poblamiento y evolución de la población canaria desde la antigüedad hasta nuestros tiempos.

1. POBLAMIENTO PREHISTÓRICO

La etapa prehistórica del Archipiélago Canario se considera, convencionalmente, como el periodo transcurrido desde la arribada de los primeros contingentes poblacionales procedentes del Norte de África - primera mitad del primer milenio - hasta la llegada de los europeos en los siglos XIV-XV, y la definitiva incorporación de las islas a la Corona de Castilla en 1496 (Navarro, 1997).

De los archipiélagos de la Macaronesia (Azores, Madeira, Cabo Verde y Canarias), Canarias era la única que se encontraba poblada cuando fueron redescubiertas en los siglos XIV y XV. En 1312, se fija la probable llegada del que se considera el redescubridor de Canarias, el genovés Lancelotto Malocello, que se asentó en Lanzarote, y de quien la Isla tomaría el nombre.

Para explicar el antiguo poblamiento de Canarias se recurre a la documentación que aportan las fuentes escritas y las arqueológicas. Las fuentes escritas engloban desde los textos clásicos - míticos como La Atlántida y no míticos como el texto del naturalista Plinio el Viejo (siglo I d.C.) - hasta los que se generan en torno a los hechos de la Conquista -las denominadas fuentes etnohistóricas- (Arco y Navarro, 1987; Martínez, 1996).

1.1 Origen de los primeros pobladores de las Islas.

Muchas han sido las teorías sobre el origen de los primeros pobladores del Archipiélago (Arco y Navarro, 1987; Navarro, 1997). En la actualidad las investigaciones arqueológicas, antropológicas y filológicas apuntan hacia un indudable origen norteafricano de las poblaciones aborígenes canarias, emparentadas con el mundo protobereber y bereber (Navarro, 1997; Springer, 2001).

Las poblaciones preromanas norteafricanas se caracterizaban por ser heterogéneas desde el punto de vista antropológico, en las que se destacaban dos componentes iniciales básicos: el cromagnoide o Mechta-Afalou y el mediterranoide, cuya presencia ya es reconocida en yacimientos del Iberomauritano (hace 20.000 años) y del Capsiense (hace 8.000 años) (Camps-Fabrer, 1989). Desde los primeros estudios de antropología física que se llevaron a cabo en poblaciones aborígenes canarias, se observó esta misma variabilidad (Verneau, 1887), destacando los componentes mechtoides y mediterranoideos (Fusté, 1958-59; Schwidetzky, 1963).

1.2 ¿Cuándo llegaron?

Los niveles arqueológicos más antiguos, identificados hasta ahora, no van más allá de la mitad del primer milenio a.C. Los distintos procedimientos de dataciones absolutas (C^{14} , paleomagnetismo), llevados a cabo en diversos yacimientos de las islas, no han sobrepasado esa fecha: Risco de Los Guanches (Icod) siglo III a.C.; Las Estacas I (Buenavista) siglo IV-II a.C.; Cueva de La Palmera (Tijarafe) siglo III a.C. La mayoría de las dataciones oscilan entre los siglos cercanos a la Era Cristiana, llegando hasta el siglo XIV (Arco y col., 1981; Navarro y col., 1990; Tejera, 1992; Arco y col., 1997).

1.3 Causas y medios del poblamiento.

Se ha destacado que múltiples causas pudieron influir en la migración de los primeros pobladores: ecológicas, económicas, estratégicas, sociales, políticas, ideológicas... (Navarro, 1997). De ellas se han esgrimido dos causas principales. La primera, económica y demográfica, pudiera ser por la progresiva desecación del Sáhara y el consiguiente aumento de la sequedad del Magreb. Este es un proceso largo que ha influido en los movimientos migratorios africanos (Arco y Navarro, 1987; Navarro, 1997). La segunda, política e ideológica, provocada por las numerosas influencias exteriores sobre el Noroeste africano, desde la fundación de Cartago en el 814 a.C., con su posterior expansión territorial, la ocupación romana que provocó el que muchos pueblos indígenas se resistieran, con múltiples levantamientos armados, entre los siglos I a.C. y III d.C. y, finalmente, las invasiones árabes en el siglo VII.

Una de las mayores dudas que tienen los historiadores es la forma de arribada de los primeros contingentes poblacionales, ya que todavía no se han encontrado señales de que los aborígenes conocieran la navegación. Sin embargo, se tiene constancia de que eran buenos nadadores y existen algunas alusiones a medios frágiles de embarcación. Por ejemplo, en La Gomera y El Hierro se recoge la tradición del uso de balsas formadas con odres inflados, y en Gran Canaria fabricaban embarcaciones con troncos ahuecados de drago, lastrados con piedras e impulsados con remos y velas de palma (Arco y Navarro, 1987). Con respecto a la forma en la que llegaron se citan cuatro posibilidades (Arco y Navarro, 1987; Jorge, 1996; Navarro, 1997):

- vinieron por sus propios medios voluntariamente
- vinieron por sus propios medios involuntariamente
- fueron traídos voluntariamente
- fueron traídos por la fuerza.

2. CONQUISTA Y COLONIZACIÓN.

2.1 El Predescubrimiento.

Con el inicio de la Edad Media, las islas del Archipiélago caen en el olvido, al compás de la fragmentación del antiguo Mare Nostrum en tres civilizaciones: el

Occidente cristiano, el Islam y Bizancio. Durante este periodo las culturas aborígenes canarias, cuyo asentamiento inicial se remontaría al último milenio a.C., conocieron un proceso de evolución propio, ajeno a influencias exteriores, que es interrumpido con el llamado redescubrimiento de las islas (Cabrera-Pérez, 1991).

Los primeros viajes a las Islas Canarias debieron realizarse hacia el fin del siglo XIII y se hicieron más frecuentes a lo largo de la centuria siguiente. Estos viajes venían organizados por comerciantes genoveses, con el apoyo de mallorquines y catalanes, impulsados por el proceso de expansión comercial y tecnológico que se había desarrollado en el ámbito mediterráneo. Por esos mismos años los marinos portugueses y castellanos comenzaron a frecuentar los bancos pesqueros africanos, lo que contribuyó a mejorar el conocimiento sobre la navegación de la zona y a incrementar el interés hacia las Islas, que ofrecían la posibilidad de la captura de esclavos y, posteriormente, suelo agrícola suficiente para permitir la implantación de cultivos como el de la caña de azúcar (Aznar Vallejo, 1992; Béthencourt Massieu, 1995)

Había, también entonces, fuertes motivaciones políticas, como la pugna existente entre las monarquías lusa y castellana por incorporar las Islas a su soberanía como paso previo a sus exploraciones, conquistas y comercio en tierras africanas.

Hay que entender la conquista y colonización de las islas ligada al proceso de expansión europea en la Baja Edad Media que se desarrolló bajo tres modalidades diferentes (Aznar Vallejo, 1992): creación de enclaves comerciales, implantación de protectorados políticos y colonización. En el plano de Canarias se puede distinguir una etapa de “precolonización”, en el siglo XIV, en la que no se buscó sustituir las estructuras aborígenes sino influir en las mismas mediante relaciones comerciales o evangelizadoras, y una etapa de auténtica “colonización” en el siglo XV. Fue entonces cuando se llevó a efecto el dominio militar del territorio, la creación de nuevos marcos político-administrativos, la remodelación de la población y la reordenación de las actividades económicas (Aznar Vallejo, 1996)

2.2 La Conquista.

La conquista de las Islas dura casi un siglo, comenzando en 1402 y terminando en 1496. Este largo proceso puede dividirse en dos fases: una primera, realizada por el normando Juan de Béthencourt (que obtiene el derecho de conquista de parte de

Enrique III de Castilla). Esta primera etapa, en la que La Corona cedía a Béthencourt y sus sucesores el derecho de conquista y colonización, se conoce en la historiografía canaria como “conquista señorial” y comprende aproximadamente desde 1402 hasta que los Reyes Católicos reclamaron, en 1477, los derechos de conquista de las islas hasta entonces insumisas (Gran Canaria, La Palma y Tenerife). La segunda etapa se conoce con el nombre de “conquista realenga” y abarca desde 1477 hasta 1496, en que se incorpora finalmente Tenerife a la Corona de Castilla (Béthencourt Massieu, 1995).

La primera isla en ser ocupada fue la de Lanzarote, en 1402, por Juan de Béthencourt, donde establecieron un pacto de amistad con un jefe aborigen (Guadarfía), fundándose un campamento, el Castillo del Rubicón, al sur de la isla. La esclavitud de los aborígenes y la ruptura de los pactos, reiniciaron los enfrentamientos con los majos. Fue necesaria la llegada de nuevos conquistadores y colonos desde Francia, y el impacto de grandes hambrunas y mortandades entre los aborígenes, para conquistar Lanzarote definitivamente en 1404.

Al tiempo que se ocupaba Lanzarote, se realizaron expediciones por el resto de las islas y se hicieron frecuentes entradas en la vecina Fuerteventura, que fue la segunda isla en ser sometida tras la llegada de nuevos refuerzos en 1405.

En estos años se intentan expediciones de conquista en otras islas, fraguando tan sólo la de El Hierro. Esta isla estaba ya escasamente poblada por la acción de los saqueos esclavistas. Fue fácilmente ocupada tras la captura de buena parte de la población aborigen y repoblada con población normanda.

Maciot de Béthencourt fue quien primero asentó en la isla de La Gomera (1420), al menos parcialmente, una serie de colonos. Desde entonces los castellanos tuvieron que sostener una enconada pugna con los portugueses por la expansión de sus dominios en las islas. A partir de 1455 y tras la construcción, por parte de Fernán Peraza el Viejo, de la llamada “Torre del Conde”, la Gomera entró de lleno en la órbita castellana. Desde esta base permanente se intentará la colonización de la isla que tropieza con la resistencia aborigen. Tras la esclavización de gran número de gomeros entre 1470 y 1480, se produce una gran rebelión en 1488 que culmina con una fuerte represión que marcaría la definitiva incorporación de La Gomera al Señorío de Canarias. Esto supuso también la muerte y el exilio de una parte de la población indígena gomera (Díaz Padilla y Rodríguez Yanes, 1990; Macías y Bravo de Laguna, 1997).

En 1478 comienza la conquista de Gran Canaria por deseo expreso de los Reyes Católicos. La primera fase abarca los años 1478-1480 y se caracteriza por una guerra de desgaste, fundamentalmente en el noreste de la isla. La segunda etapa comprende los años 1480-1483, produciéndose la disgregación definitiva de los efectivos poblacionales aborígenes por las constantes razias y las epidemias. Los últimos enfrentamientos en Ajodar y Ansite, pese a las pérdidas que sufrieron los castellanos, supusieron la definitiva entrega de la isla en 1483.

La Palma había sido sometida a lo largo del siglo XV a una serie de razias esclavistas y varios intentos de conquista. Finalmente la empresa la asumió Alonso Fernández de Lugo, que tras vencer la mayor resistencia opuesta en la zona central de la isla (Tanausú) incorpora la isla a la Corona de Castilla en 1493.

Tenerife también había conocido a lo largo del siglo XV una amplia presencia de comerciantes, misioneros y navegantes. La conquista de la isla, emprendida también por Alonso Fernández de Lugo, fue un proceso relativamente corto (1494-1496), en el que se pueden distinguir varias etapas. La primera (1494) llevó a los conquistadores desde sus bases de Añazo hasta el actual municipio de La Matanza, donde las tropas invasoras fueron destruidas. La segunda etapa viene marcada por dos victorias castellanas (La Laguna y Acentejo). En 1496 se hicieron las últimas incursiones por el norte de la isla que, junto a los estragos causados por una epidemia –modorra- entre los guanches, acabaron con la rendición de los últimos insumisos. A mediados de 1496 se dan por finalizadas las operaciones bélicas en la isla, concluyendo así la conquista de las islas de realengo. (Aznar-Vallejo, 1992; Macías y Bravo de Laguna, 1997).

2.3 La Colonización.

Las características de la población también separan las dos etapas de la conquista señorial y realenga en Canarias. La etapa señorial se caracterizó por una población poco numerosa, mientras que es a partir de la conquista realenga cuando se produce un aumento considerable en el número de pobladores y una diversificación de los elementos constitutivos.

Los integrantes de la etapa señorial eran básicamente franceses, castellanos e indígenas. Los mismos fueron fundiéndose poco a poco, de tal modo que a finales del siglo XV sus miembros eran denominados en las zonas realengas como “gentes

de las islas”, sin hacer distinción de su procedencia. La población de la etapa realenga se define por un importante crecimiento fruto de tres elementos fundamentales: la conservación de las comunidades indígenas, mayor número de repobladores y sustantivo aumento de la esclavitud (Aznar-Vallejo, 1992).

El grupo más amplio de pobladores lo formaban los Europeos en su mayoría españoles, portugueses y genoveses. Dentro de los españoles, la mayoría provenían de Andalucía, aunque también había extremeños, castellanos y gallegos.

Debido al proceso de conquista, parte de los aborígenes murieron de manera violenta en las batallas, otros fueron deportados como esclavos y otros tantos murieron por las enfermedades traídas por los nuevos pobladores frente a las cuales no estaban inmunizados. Sin embargo, muchos tuvieron mejor suerte. Aquellos que se habían aliado no sufrieron muchas bajas, al igual que las mujeres y niños. Además, la política de Isabel la Católica favoreció la supervivencia del pueblo guanche y su mestizaje (Hernández, 1999). Con todo ello, según los datos del Cabildo de Tenerife, en 1513 la población guanche estaba en torno a las 600 personas. Los datos del Obispado de Canaria dan para 1504, 1.200 familias aborígenes en todo el Archipiélago (Aznar-Vallejo, 1991). De todos los aborígenes, los gomeros y los guanches fueron los que más problemas tuvieron para adaptarse. La mayoría de los isleños que no estaban esclavizados se dedicaban sobre todo a la ganadería, aunque también a labrar la tierra y a la apicultura.

El tercer contingente de pobladores fueron los Africanos, de los que sólo se distinguían dos grupos: los moriscos y los negros. Los moriscos se dedicaban a la agricultura y al comercio, contribuyendo en los rescates y las cabalgadas como intérpretes, guías o en la adquisición de mercancías. Los negros se dividían en aquellos que eran esclavos y en prietos libres. Una parte se dedicaba a la agricultura y otra al transporte con animales o a oficios mecánicos (Aznar-Vallejo, 1991).

3. STA. CRUZ DE TENERIFE

En un principio, Santa Cruz fue una población pastoril, carácter que se conservaría hasta comienzos del siglo XVIII. La nueva economía, agrícola y mercantil, se insinúa gradualmente, sin suprimir las bases de la modesta economía indígena, basada en la cría de ganado caprino (Cioranescu, 1998). La colonización se hizo aprovechando la salida de los barrancos al mar, situación privilegiada por su

cercanía al puerto, desplazando de sus tierras a los indígenas, que tras la conquista fueron considerados un estorbo y un problema para los conquistadores. Bajo cualquier pretexto los guanches fueron dispersados, sus tierras confiscadas y en muchos casos fueron esclavizados. En 1519 se estima que la población indígena de Tenerife no sería mayor de 3.000 (Cioranescu, 1998). A los guanches, se unieron muchos gomeros desterrados y canarios que, tras intervenir en la conquista, habían sido compensados con datas, adquiriendo un estatus superior.

La primera colonización de la costa de Añazo se hizo por repartición de tierras gratuitamente a los pobladores y conquistadores, bajo ciertas limitaciones y condiciones, tales como la residencia en la misma y que no se pudieran vender las tierras antes de 5 años. Sin embargo, el desarrollo de la población fue demasiado lento y muchos vecinos se fueron debido a las malas condiciones económicas. En 1561, se estima para Santa Cruz una cifra de 57 vecinos, es decir viviendas (alrededor de 770 habitantes), de los que 36 son españoles, 3 indígenas (un guanche, un gomero y un canario) y tres extranjeros (un portugués, un italiano y un inglés). Un siglo más tarde, en 1676, se llega a los 2.334 habitantes, habiéndose duplicado la población en tan solo 20 años. A principios del siglo XVIII, la población da un salto demográfico, coincidiendo con una época de prosperidad que favorece el desarrollo de los centros urbanos. Santa Cruz pasa a ser el puerto principal de las islas, al que llegan multitud de navíos ingleses, holandeses, suecos y daneses. La conformación de la población de Santa Cruz es parecida a la del resto de la isla, pero con un porcentaje de inmigración extranjera algo superior. Los habitantes se pueden dividir en cuatro grandes grupos: los indígenas, los peninsulares, los extranjeros europeos y los esclavos.

Hasta el siglo XVIII, en el que se obliga a mencionar la procedencia en las partidas de casamiento, no se tiene constancia exacta del lugar de origen de los pobladores. En estas partidas, sorprende que el 98% de las mujeres que se casan son nacidas en las Islas, lo que indica su papel en la formación de la sociedad insular y en su estabilización. Dentro de los españoles destacan los andaluces (más de un 39%), gallegos y los muchos provenientes de América. Con respecto a los forasteros, son mayoría los franceses (más de un 37%), portugueses e italianos. En cuanto a los esclavos, en Tenerife hay de todo: esclavos blancos que resultan ser berberiscos; esclavos negros, esclavos indios o americanos, y de vez en cuando esclavos de las indias portuguesas. En los primeros tiempos de colonización, la mayor parte de los

esclavos de Tenerife eran guanches, más tarde, la mayoría la constituyeron los negros y moriscos. Numerosos esclavos alcanzaron la libertad y vivieron en común con los españoles, mezclándose con ellos (Cioranescu, 1998).

3.1 La Iglesia de la Concepción

Una práctica característica de la religión Católica desde la Baja Edad Media hasta principios del siglo XIX fue la de enterrar los muertos dentro y en los alrededores de las iglesias. La Concepción es un buen ejemplo de ello en Canarias, pues su uso funerario se constata desde su fundación en 1501 hasta la apertura del primer cementerio civil en 1823 (Larraz Mora y González Marrero, 1995). Un estudio publicado recientemente sobre los Libros de Defunciones de la Parroquia Matriz registra más de 12.000 entierros en el interior del templo y más de 15.000 si se cuentan los del exterior (Sanz de Magallanes, 2001). Estos 16 libros, a falta del primero, recogen todos los enterramientos de los que ha quedado constancia y teniendo en cuenta que, salvo en unas pocas excepciones, morían en Santa Cruz los que ahí residían, nos da una idea de cómo era esa sociedad desde el último tercio del siglo XVII (Sanz de Magallanes, 2001).

4. ESTUDIOS GENÉTICOS PREVIOS SOBRE LA POBLACIÓN CANARIA.

4.1 Marcadores autosómicos.

Los primeros estudios con marcadores genéticos fueron realizados por Guasch y col. en 1952 con el sistema Rh, mostrando a los Canarios como una población típicamente europea con cierta mezcla africana. Los mismos resultados se obtuvieron posteriormente utilizando otros grupos sanguíneos (Bravo y de las Casas, 1958; Parejo, 1966; Roberts y col., 1966; Rössig, 1967; Pinto y col., 1996b). Concretamente, para el sistema AB0 se encontró una alta frecuencia del alelo 0 en 370 momias provenientes de Gran Canaria y Tenerife (Schwarzfischer y Liebrich, 1963) al igual que en la población actual de La Gomera, lo que los relaciona con poblaciones del Noroeste africano.

Los polimorfismos enzimáticos confirman un componente africano en la población, con ciertas variantes inequívocamente procedentes del subsáhara. Tal es

el caso de la variante R del locus *ACP-1* (fosfatasa alcalina), que alcanza valores de 1'1 y 6'8% en el noroeste africano y subsáhara, respectivamente, no se encuentra en la península, pero si en Gran Canaria (0'8%) y en Lanzarote (0'6%) (Martell y col., 1986; Morilla y col., 1988; Pérez y col., 1991; Pinto y col., 1994). Lo mismo ocurre con el alelo negroide A+ del locus *G6PD* (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa), que se encuentra en un 27% en el África subsahariana y en las islas desde un 0'5% en La Gomera hasta un 3% en Lanzarote (Morilla y col., 1988; Afonso y col., 1989). La presencia de la variante *G6PD- Seattle* en Canarias (Cabrera y col., 1996) también ha servido para relacionar las islas con el noroeste africano, al no haberse encontrado esta variante en descendientes de peninsulares pero si en la población autóctona (Pinto y col., 1994). También se considera como contribución aborigen a la población actual, la alta incidencia de la hemoglobinopatía Hb-D-Los Ángeles, puesto que ésta solo aparece esporádicamente en la península ibérica (Malcorra y col., 1990). Los estudios de los loci *KM* y *GM* junto con polimorfismos de restricción en genes de inmunoglobulinas (Esteban y col., 1998), sólo han podido detectar una cierta influencia sub-sahariana en la población. Uno de los resultados más interesantes se han obtenido mediante el estudio de los haplotipos del sistema *CD4/Alu* en Canarias (Flores y col., 2001b). En este estudio se observa que tan solo Gran Canaria, Tenerife y El Hierro muestran diferencias significativas con el noroeste africano. Además, un haplotipo exclusivo de esta zona africana (Flores y col., 2000), se encontró en la mayoría de las islas, relacionándolas directamente con ella.

4.2 El ADN mitocondrial.

La molécula de ADN mitocondrial (ADNmt) tiene un tamaño relativamente pequeño (16570pb), se hereda exclusivamente por vía materna sin sufrir fenómenos de recombinación, y presenta una tasa de mutación 5-10 veces mayor que la nuclear (Ingman y col., 2000), lo que hace de ella una herramienta indispensable para los estudios sobre el origen y evolución de las poblaciones. Los estudios de esta molécula se han realizado por medio de polimorfismos de restricción (Torrioni y col., 1994a,b,c; Chen y col., 1995; Graven y col., 1995; Passarino y col., 1996), así como por secuenciación de la región control, la más polimórfica de toda la molécula (Horai y Hayasaka, 1990), para estudiar las poblaciones humanas (Vigilant y col., 1989;

Piercy y col., 1993; Horai y col., 1996; Watson y col., 1997; Richards y col., 1998; Comas y col., 2000; Torroni y col., 2001).

El primer estudio de ADNmt en las islas (Pinto y col., 1996a), mostró diferencias en cuanto a las contribuciones obtenidas anteriormente, observándose un componente Africano bastante elevado (43% bereber y 21% subsahariano). En un estudio más amplio (Rando, 1998), se observó en todas las islas un tipo de secuencias pertenecientes al sub-haplogrupo U6, que es considerado de origen norteafricano (Côrte-Real y col., 1996; Rando y col., 1998). En este estudio se propuso un modelo de colonización basado en una sola oleada que llegaría a las islas más orientales e iría pasando de isla en isla, hasta llegar a las más occidentales (Rando y col., 1999).

4.3 Cromosoma Y.

El cromosoma Y se considera la contrapartida del ADNmt al heredarse por vía paterna, de padres a hijos. Éste tiene un tamaño mucho mayor (aproximadamente 60×10^6 pares de bases) y una tasa de mutación 5-10 veces menor que la del ADNmt (Thomson y col., 2000). Hasta el momento se han descrito más de doscientos polimorfismos (Hammer y col., 2001; Underhill y col., 2001), que unidos a marcadores como los microsatélites (Jobling y Tyler-Smith, 1995), han permitido datar su evolución a distintas escalas de tiempo.

Los estudios del cromosoma Y en Canarias (Flores, 2001), muestran una distribución bastante homogénea de linajes paternos en todas las islas. La composición, sin embargo, difiere mucho con respecto a la obtenida con los datos del ADNmt con un 93% de linajes europeos, 6% de linajes del noroeste africano y solo un 1% de linajes subsaharianos (Flores, 2001). Además, se distinguen dos oleadas de colonización, una hace aproximadamente 2000 años proveniente de la zona sahariana, y una segunda, hace unos 600 años de la zona del Magreb. Esto contrasta con los datos del ADNmt en los que solo se detectó una oleada de colonización (Rando y col., 1999).

5. ESTUDIOS DE ADN ANTIGUO.

La posibilidad de la caracterización genética de individuos e incluso de poblaciones prehistóricas e históricas, se hizo posible gracias a dos descubrimientos contemporáneos (Witas, 2001). Por un lado, la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR), que amplifica enzimáticamente un bajo número de copias de ADN en millones, para su posterior estudio molecular (Saiki y col., 1985; Mullis y Faloona, 1987). Por otro, se comprobó que muchas veces el ácido nucleico de restos antiguos estaba lo suficientemente bien preservado como para ser recuperado y analizado (Pääbo, 1986). De esta forma, se ha abierto un nuevo campo de investigación en los últimos años que incluye a la genética, paleontología, antropología y arqueología (Lalueza, 1996a).

5.1 Degradación post-mortem del ADN.

Cuando un organismo muere, su ADN empieza a degradarse por acción de nucleasas endógenas. El intervalo de tiempo entre la presencia de moléculas de ADN nativas y su destrucción completa depende de la naturaleza física y química de su entorno. Así, cuanto más rápido sea su proceso de desecación, cuanto más baja sea la temperatura y/o la concentración de sales, mejor será la conservación del ADN (Hofreiter y col., 2001b; Witas, 2001). Asumiendo concentraciones de sales fisiológicas, pH neutro y una temperatura de 15°C, se tardaría unos 100.000 años para que todo el ADN fuera destruido (Pääbo y Wilson, 1991; Lindahl, 1993).

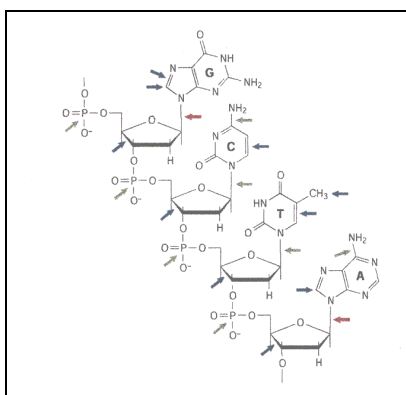


Figura 1. Esquema de la estructura del ADN y la localización de las posibles alteraciones. Las flechas rojas corresponden al lugar de depurinización; las flechas azules a los lugares donde afectan los procesos oxidativos y las flechas verdes a los de daños hidrolíticos.

Varios son los procesos que afectan a la estructura del ADN. Por un lado la presencia de agua y oxígeno modifican las bases nitrogenadas y el esqueleto azúcar-

fosfato del ADN. Además procesos de desaminación, depurinación y otras reacciones hidrolíticas llevan a la desestabilización y rotura de las moléculas de ADN (Hofreiter y col., 2001b). Todos estos fenómenos dificultan la obtención de secuencias de ADN antiguo, puesto que, por ejemplo, una alta proporción de residuos de citosina y timina en extractos de ADN son modificados a *hidantoinas* que bloquean a las polimerasas y por tanto a la PCR (Höss y col., 1996; Hofreiter y col., 2001a).

5.2 Recuperación de ADN antiguo.

El primer estudio de secuencias de ADN antiguo fue a partir de músculo disecado del quagga, perteneciente a los equinos (Higuchi y col., 1984), y posteriormente se pudo demostrar su relación con las cebras (Higuchi y col., 1987). Al año siguiente, apareció la noticia del clonaje y secuenciación de ADN de momias egipcias (Pääbo, 1985a,b), sin embargo este resultado ya no es aceptable tal y como comentan Cooper y Wayne (1998), sobre todo teniendo en cuenta el tamaño del fragmento clonado (3'4kb).

Desde esos comienzos, hace apenas 20 años, han sido numerosos los estudios realizados sobre todo tipo de muestras, sin embargo muchos, a posteriori, han resultado tremendos fracasos. Tal es el caso de la obtención de secuencias de ADN de plantas del Mioceno, *Magnolia* y *Taxodium* (Golenberg y col., 1990; Soltis y col., 1992). Los datos obtenidos no fueron reproducibles y lo que se observó fue una gran cantidad de ADN de origen bacteriano (Sidow y col., 1991). Otro de los grandes descubrimientos que resultó ser un fracaso aún mayor, fue la recuperación de ADN de huesos de dinosaurio de hace 80 millones de años (Woodward y col., 1994b). Tras un re-análisis, se demostró que la secuencia obtenida era de mamífero (Allard y col., 1995; Henikoff, 1995; Young y col., 1995), seguramente inserciones nucleares del ADNmt humano (Hedges y Schweitzer, 1995; Zischler y col., 1995). A principios de los noventa, se hicieron muchos estudios de extracción de ADN de varios insectos fosilizados en ámbar (Cano y col., 1992, 1993; De Salle y col., 1992), sin embargo éstos también han resultado ser irreproducibles (Austin y col., 1997a; Walden y Robertson, 1997).

Pero, afortunadamente, no todos los estudios de ADN antiguo han sido fracasos. En estos 20 años de andadura se han obtenido muchos resultados valiosísimos para

los que se ha demostrado su autenticidad. Probablemente, la extracción de ADN de restos del hombre de neandertal es uno de los trabajos más importantes que se han realizado. Los primeros datos se publicaron por Krings y col. (1997), quienes secuenciaron la región hipervariable I del ADNmt de un neandertal encontrado en el siglo XVIII en el valle de Neander (Alemania) y llegaron a la conclusión de que los neandertales no contribuyeron al acervo genético de los humanos modernos, por lo menos en lo que al ADNmt se refiere. Dos años más tarde, se publicaron los resultados obtenidos tras secuenciar la región hipervariable II del mismo individuo, llegándose a la misma conclusión (Krings y col., 1999a). Posteriormente se han realizado más estudios sobre el ADNmt de otros neandertales (Krings y col., 2000; Ovchinnikov y col., 2000), siendo estos parecidos, pero no iguales al primer espécimen estudiado (Höss, 2000). Recientemente, se han efectuado estudios sobre otro resto de neandertal, encontrado también en el valle de Neander (Schmitz y col., 2002), resultando similar a los anteriores. Por último, el trabajo de Gutiérrez y col. (2002) reanaliza las secuencias obtenidas de los neandertales y los comparan con bases de datos de humanos y primates, para llegar a la conclusión de que no son tan divergentes como se pensaba en un primer instante.

A parte de los neandertales, también se han obtenido datos de restos humanos de hasta 60.000 años provenientes de Australia (Adcock, y col., 2001), del llamado “hombre de hielo” de aproximadamente 5.000 años (Handt y col., 1994b) y de restos encontrados en los Alpes de hasta 14.000 años (Di Benedetto y col., 2000).

También se han realizado diversos estudios de poblaciones antiguas humanas, la mayoría dedicados a poblaciones pre-colombinas norteamericanas (Stone y Stoneking, 1993; Parr y col., 1996; Carlyle y col., 2000; Kaestle y Smith, 2001), y sudamericanas (Lalueza Fox, 1996a,b; Monsalve y col., 1996; Ribeiro-dos-Santos y col., 1996), aunque también se han estudiado otras poblaciones incluyendo japonesas (Oota y col., 1995), nubias (Lalueza Fox, 1997), caribeñas (Lalueza Fox y col., 2001) y de la Península Ibérica (Izagirre y de la Rúa, 1999; Montiel y col., 2001).

El ADNmt no ha sido la única parte del genoma humano objeto de estudio en restos arqueológicos. Así, podemos encontrarnos con trabajos sobre mutaciones en el gen de la β -talasemia (Filon y col., 1995), en el de la β -globina (Béraud-Colomb y col., 1995) y en los del complejo HLA (Anzai y col., 1999; Fischer y col., 2001). Igualmente merecen destacarse los estudios de microsatélites tanto autosómicos

(Kurosaki y col., 1993; Burger y col., 1999) como del cromosoma Y (Gerstenberger y col., 1999; Schultes y col., 1999) en muestras humanas antiguas.

Las mismas técnicas se han utilizado para la extracción de ADN antiguo de diversas especies además de los humanos. Así, se han estudiado aves extintas (Cooper y col., 1992, 2001; Sorenson y col., 1999), mamuts (Hagelberg y col., 1994; Höss y col., 1994; Greenwood y col., 1999), bóvidos (Lalueza-Fox y col., 2000), ratas (Matisoo-Smith y col., 1997), conejos (Hardy y col., 1995), monos (Bailey y col., 1999), cerdos (Watanobe y col., 2001) y perezosos (Greenwood y col., 2001).

Otro tipo de estudio que se ha realizado en el campo del ADN antiguo es la detección de agentes etiológicos de diversas enfermedades en restos humanos. De esta forma, se han encontrado casos de tuberculosis en momias pre-colombinas de sudamérica (Salo y col., 1994; Arriaza y col., 1995) y en esqueletos medievales de Inglaterra (Mays y col., 2001), casos de peste en enterramientos franceses (Drancourt y col., 1998; Raoult y col., 2000) y otros casos de bacterias patógenas y parásitos presentes en momias egipcias (Zink y col., 2000, 2001) y sudamericanas (Ferreira y col., 2000).

Últimamente los trabajos no se han limitado sólo a restos de tejidos, óseos y dentales, sino que se han podido identificar especies ingeridas a partir de excrementos fosilizados llamados *coprolitos*. De esta manera se ha caracterizado la dieta de nativos americanos de hace más de 2.000 años (Poinar y col., 2001), al igual que la dieta de perezosos de hasta aproximadamente 28.000 años (Poinar y col., 1998; Hofreiter y col., 2000).

6. OBJETIVOS.

Por lo que se ha visto anteriormente, las Islas Canarias fueron colonizadas en un primer momento por unos pobladores provenientes del noroeste Africano, y tras su conquista en el siglo XV, sufrieron numerosas entradas de contingentes europeos, norteafricanos y sub-saharianos, sin tener en cuenta los movimientos inter-insulares. Además, los avances en la biología molecular han hecho posible el obtener ADN de muestras antiguas para su estudio a genético. Por esta razón, nos hemos propuesto en este trabajo los siguientes objetivos:

1. La puesta a punto de un protocolo de extracción de ADN antiguo a partir de muestras dentarias que minimice el número de pasos y, por tanto, las probabilidades de contaminación de las muestras.
2. La caracterización genética de la población tinerfeña del siglo XVIII, por medio de la amplificación y secuenciación de la región hipervariable I del ADNmt y PCR-RFLP.
3. La caracterización genética de las poblaciones prehispánicas, mediante la amplificación y secuenciación de la región hipervariable I del ADNmt y su confirmación por PCR-RFLP.
4. La comparación de ambas poblaciones con la población actual, para observar la evolución del acervo genético de la isla desde antes de la Conquista hasta hoy en día, y contrastarla con la información histórica.
5. La secuenciación completa del ADNmt de distintos linajes correspondientes al sub-haplogrupo U6 para inferir las edades de coalescencia de los 2 sub-grupos, U6a y U6b, presentes principalmente en el Norte de África y Canarias.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS.

1.1. Muestras de población histórica.

La muestra de la población que habitaba la isla de Tenerife en los siglos XVII y XVIII, procede de 5 dientes provenientes de la Ermita de San Blas en Candelaria y de 208 dientes, de diferentes restos humanos, del yacimiento de la Iglesia de La Concepción de Santa Cruz de Tenerife. Las excavaciones de esta última se realizaron, entre los años 1993 y 1995, por miembros del Departamento de Prehistoria, Antropología e Historia Antigua de la Universidad de La Laguna, interviniéndose un total de 207 fosas con restos pertenecientes a 776 individuos, siendo, hasta hoy, el mayor espacio sepulcral de esta naturaleza excavado en Canarias (Arnay de la Rosa, comunicación personal). La distribución de las fosas analizadas se indica en la figura 2. Las muestras dentarias se eligieron de 33 fosas, intentando, siempre que fue posible, estudiar un solo tipo de diente por fosa, para evitar la repetición de los individuos en la muestra analizada (Izagirre y de la Rúa, 1999). En algunos casos se obtuvieron fragmentos de mandíbula con más de un diente, por lo que se pudieron realizar extracciones independientes de un mismo individuo. A la hora de seleccionar los dientes a estudiar, siempre se tuvo especial cuidado en que no presentasen fracturas ni grietas. La elección del material dentario, frente a otros restos, se realizó por dos razones fundamentales: la primera, porque este tipo de material es el que con mayor abundancia se encuentra en la excavación y, además, se halla en mejor estado de conservación que otros restos óseos. La humedad a la que se han encontrado sometidos los cadáveres ha afectado muchísimo a los huesos, en los que, en estudios preliminares hechos en la Universidad Autónoma de Barcelona, se han detectado gran cantidad de hongos (Malgosa y col., comunicación personal). La segunda razón es que se ha comprobado que la eficiencia en la extracción de ADN es mayor en dientes que en huesos (Oota y col., 1995; Zierdt y col., 1996; Montiel y col., 1997; Izagirre y col., 1998; Meyer y col., 2000). Esto es debido a que la cavidad pulpar, que está rellena de tejido pulpar, es una fuente extraordinaria de componentes celulares. Además, el esmalte que rodea la cavidad evita la invasión bacteriana del exterior, por lo que el ADN permanece en unas condiciones internas estables. El alto contenido de hidroxapatita en la dentina también aumenta la estabilidad del ADN (Ginther y col., 1992; Yamada y col., 1997; Ohira y Yamada, 1999).

ALTAR MAYOR

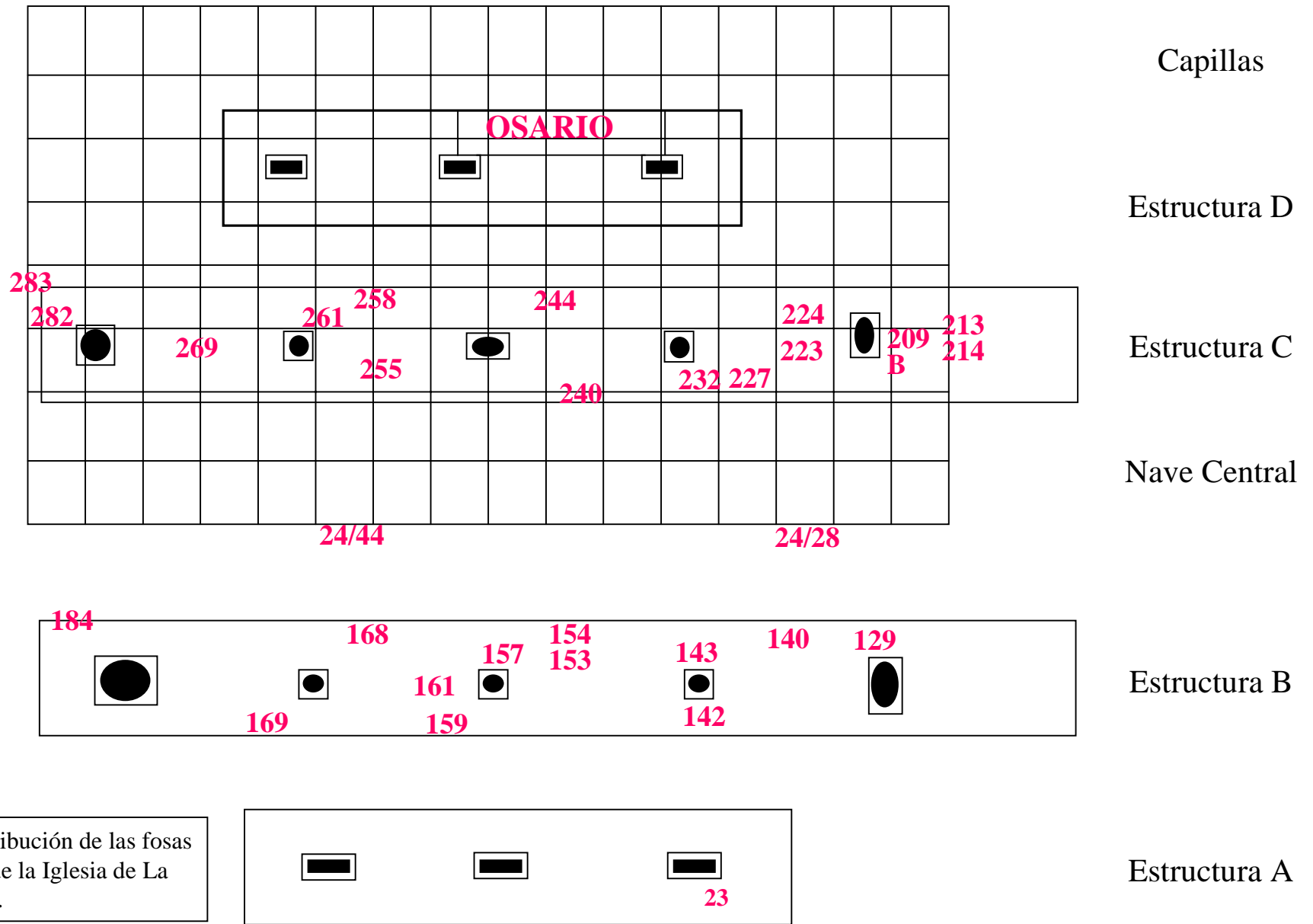


Fig. 2. Distribución de las fosas analizadas de la Iglesia de La Concepción.

1.2. Muestras de población aborigen.

La muestra aborigen está constituida por 109 dientes provenientes de diversas excavaciones de las islas de Tenerife (53), Gran Canaria (7), El Hierro (17) y La Gomera (32). Todo el material antropológico utilizado corresponde a distintos proyectos de investigación que presentaban los permisos pertinentes para su estudio genético. La localización de los yacimientos se encuentra en la figura 3. Dada la escasez de muestras disponibles, no se pudo escoger un tipo de diente en particular, siendo la única excepción la muestra de La Gomera de los que se escogieron preferentemente dientes anteriores (incisivos y caninos). En la tabla 1a, b y c se detallan las firmas y yacimientos de los dientes extraídos para las islas de Tenerife, La Gomera y El Hierro, respectivamente. Los 7 dientes de Gran Canaria provienen del yacimiento de Guayadeque.

Tabla 1a. Relación de dientes aborígenes extraídos de Tenerife.

DIENTE	YACIMIENTO	DIENTE	YACIMIENTO
A1	8-Arenas1 (Cuad. 17-NII)	A35	C-1 (Cva Bermeja) Molar superior
A2	11-Arenas (Sector 16-superficie)	A36	C-2 (Cva Bermeja) Molar superior
A3	6-Arenas1 (Cuad. 16-NI)	A37	C-3 (Cva Bermeja) Incisivo
A4	9-Arenas1 (Cuad. 8; Sec.1; NIII; Lev 2)	A38	CP-Tegueste
A5	10-Arenas (Sector 11-superficie)	A39	CP-178
A6	CP5-Canino superior derecho	A40	CP-696 1 ^{er} premolar izq
A7	7-Arenas1	A41	CP-184
A15	Arenas1 (Cuad. 15-NIII; Lev 5)	A42	CP-164
A17	CP-173 Incisivo inf. lat. dcho.	A43	CP-9
A18	MA-710 Canino superior izq.	A44	CP-920
A19	CP-165 Incisivo central inf. dcho	A45	CP-148
A20	CPA Canino inferior izquierdo	A46	CP-7
A21	MA1-757 Incisivo lat. inf. Izq.	A47	CP-158
A22	CP-178 Canino	A48	CP-178
A23	CP-184 Canino inferior derecho	A49	CP-179
A24	MA-747 Canino superior izq.	A50	CP-168
A25	MA1-775 Incisivo centr. sup. der.	A51	CP-153
A26	MA1-725 Incisivo lat. sup. der.	A52	CP-176
A27	MA1-781 Incisivo centr. inf. der	A53	CA-4
A28	CP-186 Incisivo inferior	A54	CP-969
A29	CP-157 Premolar inferior	A55	CP-165
A30	MA1-724 Incisivo centr. inf. izq.	A56	CP-185
A31	MA1-727 Incisivo centr. inf. der.	A57	CP-X
A32	MA1-715 Incisivo lat. sup. izq.	A58	CP-149
A33	CP-164 Incisivo inferior	A59	CP-157
A34	CP-140 Incisivo inferior	A60	CP-141

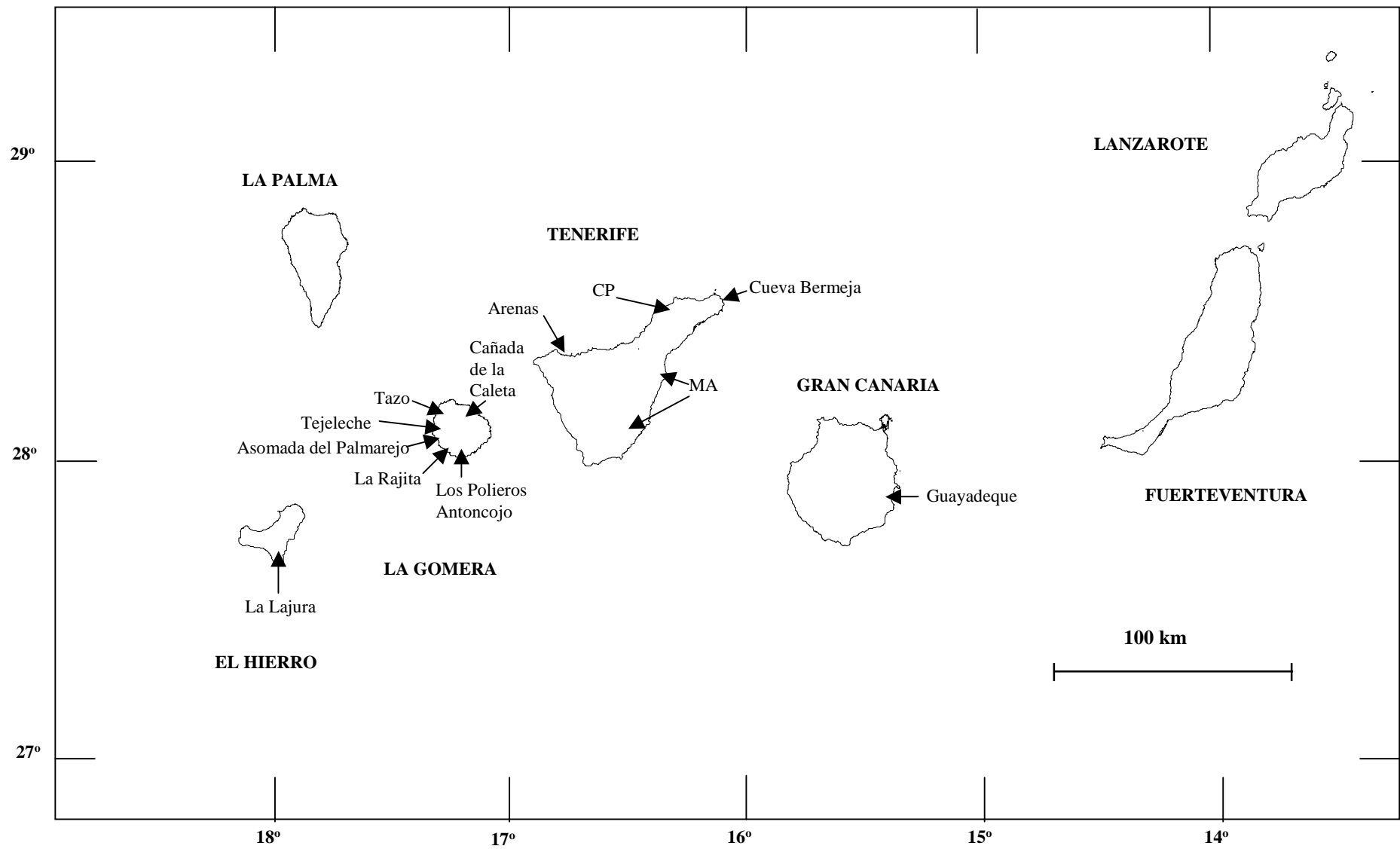


Fig. 3. Localización de los yacimientos pre-hispánicos estudiados.

Tabla 1b. Relación de dientes aborígenes extraídos de La Gomera.

DIENTE	YACIMIENTO	DIENTE	YACIMIENTO
G1	Tejeleche (TAG-83)	G17	Antoncojo (GAM-3)
G2	Los Polieros (Cueva E)(Izq-9)	G18	Tejeleche (TAG-83)
G3	Cañada de la Caleta (Rio-6)	G19	Tejeleche (TAG-83)
G4	Tejeleche (TAG-83)	G20	Antoncojo (GAM-3)
G5	Los Polieros (Cueva E) (Izq-9)	G21	Tejeleche (TAG-83)
G6	Antoncojo (GAM-3)	G22	Los Polieros (Cueva E) (Izq-9)
G7	Tejeleche (TAG-83)	G23	Tejeleche (TAG-83)
G8	Antoncojo (GAM-3)	G24	Los Polieros (Cueva E) (Izq-9)
G9	Los Polieros (Cueva E) (Izq-9)	G25	Tejeleche (TAG-83)
G10	Antoncojo (GAM-3)	A8	Tejeleche 10 (Cueva 1)
G11	Tejeleche (TAG-83)	A9	Tejeleche 6 (Cueva 1)
G12	Antoncojo (GAM-3)	A10	Cva. de los Huesos 3 (La Rajita)
G13	Tejeleche (TAG-83)	A11	Quebrada de la Sabina 14 (Tazo)
G14	Los Polieros (Cueva E) (Izq-9)	A12	Tejeleche 11 (Cueva 1)
G15	Antoncojo (GAM-3)	A13	Tejeleche 9 (Estrato superficial)
G16	Tejeleche (TAG-83)	A16	Asomada Palmarejo 2 (Arure)

Tabla 1c. Relación de dientes aborígenes extraídos de El Hierro.

DIENTE	YACIMIENTO
H1	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 12) 2964 molar
H2	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 12B) 3044 ₁ molar
H3	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 11) 2467 ₆ anterior
H4	Lajura (Z1; C7; N3) 142 molar
H5	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 11) 2778 ₁ molar
H6	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 11) 2778 ₁₀ anterior
H7	Lajura (C1; Lev 12) 2895 ₃ premolar
H8	Lajura (Z1; C1; N4) 159 anterior
H9	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 13/1) 3185(3) anterior
H10	Lajura (Z1; C1; Sector 1a; N5) 194 anterior
H11	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 4) 856 molar
H12	Lajura (Z1; C1; Sector 1c; N5; Lev 2) 520 premolar
H13	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 11) 2778 ₄ anterior
H14	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 5) 1100 premolar
H15	Lajura (Z2; C1; N5; Lev 9) 1811
H16	Lajura (Z1; C1; N5; Lev 13/1) 3185(1)
H17	Lajura (Z1; C1; Sector 1a; N5) 317 anterior

2. LIMPIEZA DE LAS MUESTRAS.

El primer paso, antes de proceder a la extracción del ADN, es la limpieza de las piezas dentarias para descontaminar la superficie de las mismas. Este es un proceso muy importante, debido a que las muestras han sido manipuladas por varias personas que han podido contaminar su superficie con ADN exógeno. Para ello, los dientes se

lavan en una solución de alto poder depurinizante (15% ácido clorhídrico), la cual inactiva el ADN superficial (Izagirre y col., 1998). A continuación se enjuaga repetidas veces la superficie del diente con agua estéril y se deja secar bajo luz UV durante 5 minutos por cada cara (Sarkar y Sommer, 1990). Una vez secos, los dientes se colocan entre dos placas metálicas y se pulverizan golpeando con un martillo. Estos restos se introducen en un tubo de 15ml de polipropileno (Costar). Cabe destacar, que al inicio de este trabajo se utilizaron tubos de poliestireno (Costar), fallando las extracciones en todos los casos.

3. EXTRACCIÓN DEL ADN.

Aunque son numerosos los protocolos descritos para la extracción de ADN antiguo (Hagelberg y Clegg, 1991; Woodward y col., 1994a; Hänni y col., 1995; Pusch y Scholz, 1997; Scholz y Pusch, 1997; Bachmann y col., 2000; Kalmár y col., 2000), en este trabajo nos hemos centrado en el protocolo de extracción de ADN basado en el uso de la “sílica” de Höss y Pääbo (1993). Es un protocolo, a nuestro juicio, muy sencillo con un número reducido de pasos, lo cual es importante a la hora de controlar la contaminación, y que nos ha dado buen resultado. Al diente pulverizado se le añade aproximadamente 1ml de una solución comercial de tiocianato de guanidina (DNAzol[®] (MRC, Cincinnati, OH) Chomczynski y col., 1997) y se deja a temperatura ambiente durante 3-4 días agitando esporádicamente. Pasado este tiempo, se purifica el ADN mediante el uso de unas columnas comerciales de sílica (QIAquick, QIAGEN) (Yang y col., 1998), según el siguiente protocolo:

-Los tubos con las extracciones se centrifugan durante 5 min. a 4.000 rpm y se recogen alícuotas de 300µl de la fase acuosa que se introducen en eppendorf de rosca de 1'5ml.

-A cada eppendorf se le añade 1ml de tampón de unión (suministrado por Qiagen) y 45µl de acetato sódico 3M pH 5'2.

-Se pasa el extracto por las columnas centrifugando durante 1 min. a 4.000 rpm.

-Se añade a cada columna 500µl de solución de lavado (suministrado por Qiagen) y se centrifuga 1 min. a 4.000 rpm.

-Se añade a cada columna 750µl de acetona (Merck) y se centrifuga durante 1 min. a 4.000 rpm.

-Se añade nuevamente 400µl de solución de lavado y se centrifuga durante 1 min. a 4.000 rpm.

-Se recentrifuga durante 1 min. a 4.000 rpm.

-A cada muestra se le añade 30µl de agua estéril y 30µl de TE (Tris-EDTA pH 8) y se dejan durante 15 min. en un baño a 50°C.

-Se centrifugan las muestras durante 2 min. a 13.000 rpm, se pasan los extractos de ADN a tubos eppendorf de rosca de 0'5ml y se guardan a -20°C.

4. ESTUDIO DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE I (RHVI) DEL ADN MITOCONDRIAL.

Dado el estado fragmentado que suele presentar el ADN antiguo (Austin y col., 1997b), se tuvo especial cuidado a la hora de diseñar los cebadores utilizados en este trabajo, intentando que el tamaño del producto amplificado no superase las 100 pares de bases (pb). Los cebadores se diseñaron a mano y con ayuda de los programas Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) y JROLIGO3 (Rozas, comunicación personal).

Para amplificar las 400pb que comprenden esta región, se han diseñado 7 parejas de cebadores solapantes, a fin de facilitar la amplificación exponencial de estas secuencias mediante la PCR y poder obtener, después, secuencias completas de la región. Las parejas de cebadores, el tamaño del producto de amplificación y la temperatura de anillamiento de cada pareja se muestran en la tabla 2.

Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 50µl utilizando 8µl de ADN molde en tampón 1X de PCR (16'6mM (NH₄)SO₄, 67mM Tris-HCl pH 8'8), 2'5-4mM MgCl₂, 0'2mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 5pmol de cada cebador y 1'75U de EcoTaq ADN polimerasa (Ecogen).

Tabla 2. Se muestra la secuencia de las 7 parejas de cebadores utilizados en la amplificación de la región hipervariable I del ADNmt, así como su temperatura de anillamiento y la longitud del fragmento amplificado.

FRAGMENTO	CEBADORES (5'→3')	TEMP (°C)	TAMAÑO
1	L1F CTCCACCATTAGCACCCAAAGC H1R AGCGGTTGTTGATGGGTGAGTC	50	112pb
2	L2F GGAAGCAGATTTGGGTACCAC H2R TGGTGGCTGGCAGTAATGTACG	50	82pb
3	L3F CACCCATCAACAACCGCTAT H3R TGATGTGGATTGGGTTTTTATGTA	46	112pb
4	L4F ACGGTACCATAAATACTTGACCA H4R TTGGAGTTGCAGTTGATGTGTGATA	50	127pb
5	L5F CAAGCAAGTACAGCAATCAACC H5R CTGTTAAGGGTGGGTAGGTTTG	46	103pb
6	L6F CACCCCTCACCCACTAGGAT H6R TGGGGACGAGAAGGGATTTG	50	111pb
7	L7F AGCCATTTACCGTACATAGCACA H7R TGATTTACGGAGGATGGTG	46	103pb

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) bajo las siguientes condiciones:

- ◆ Un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 2 min.
- ◆ 35 ciclos de:
 - ◆ Desnaturalización de las cadenas de ADN a 94°C durante 10 seg.
 - ◆ Anillamiento de los cebadores a las cadenas de ADN molde a una temperatura de 46-50°C, según la pareja de cebadores, durante 10 seg.
 - ◆ Extensión de las cadenas que tiene lugar a 72°C durante 10 seg.
- ◆ Extensión final de los productos de amplificación a 72°C durante 5 min.

La detección de los productos amplificados se realizó mediante separación electroforética en geles verticales de poliacrilamida nativa al 6% (PAGE, del inglés Poly-Acrilamide Gel Electrophoresis) en tampón TBE 1X (10'8g/l de Tris, 5'5g/l de ácido bórico, 372mg/l de EDTA-Na₂ todo a pH 8'3) usando una cubeta X-Cell™ MiniCell (NOVEX). Para elaborar estos geles la cubeta incluye casetes de 10 x 10 cm con espaciadores incorporados y peines de 10-15 pocillos. Para preparar los geles, se parte de una solución madre de acrilamida: bisacrilamida al 30% (29:1) que se obtiene mezclando 29g de acrilamida con 1g de N,N'-metilen-bis-acrilamida y enrasando hasta 100ml con agua estéril. Una vez homogeneizada se hace pasar a través de un filtro tipo HA (Milipore) mediante una bomba de vacío. A partir de 2ml de esta solución al 30% y añadiendo 7ml de agua, 1ml de TBE 10X (108g/l de Tris,

55g/l de ácido bórico y 3'72g/l de EDTA-Na₂, todo a pH 8'3), 5µl de N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) y 100µl de peroxidisulfato de amonio (100mg/ml), se obtiene la solución para el gel que se vierte cuidadosamente en el casete y se sella con el peine. Tras 15 min. de polimerización, se cargan 5µl del producto de amplificación junto con 1'5µl de tampón de carga (0'07g azul de bromofenol, 0'07g xileno-cianol, 12ml de glicerol, enrasado hasta 40ml con agua estéril). Las electroforesis se corrieron a un voltaje constante de 30V/cm durante 20 min, y luego los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (1µg/ml) durante 15 min. y se sometieron a UV en un transiluminador (Gelprinter Plus, TDI), que permite el estudio en pantalla de los resultados, su almacenamiento y copia en papel.

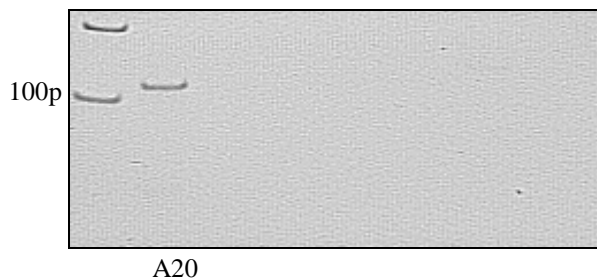


Fig. 4. Amplificación de la muestra A20 con los cebadores L1F/H1R, obteniéndose un fragmento de 112pb.

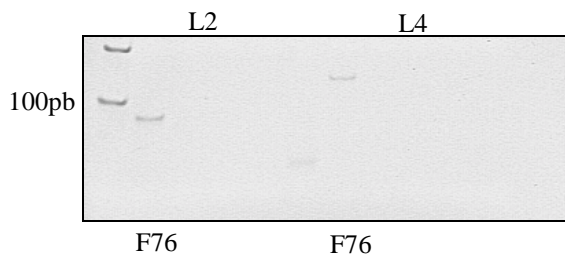


Fig. 5. Amplificaciones L2F/H2R y L4F/H4R de la muestra F76, obteniéndose productos de 82 y 127pb, respectivamente.

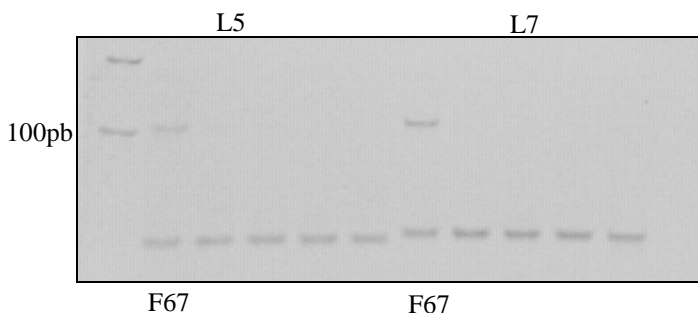


Fig. 6. Amplificaciones L5F/H5R y L7F/H7R de la muestra F67, obteniéndose productos de 103pb en ambos casos.

4.1 Amplificación al azar con cebadores degenerados.

En este tipo de amplificación se utiliza un solo cebador degenerado (5' NNNNNNNNNNNNNNNN 3') que produce una amplificación general de todo el ADN contenido en el extracto. Tras esta amplificación general, se realiza una

segunda amplificación utilizando los cebadores específicos. Este tipo de amplificación ha demostrado ser útil para la obtención de resultados positivos en muestras en las que era difícil la amplificación directa, al igual que en muestras de las que nunca se habían obtenido resultados (Pusch y col., 2000). También posee la ventaja de aumentar la cantidad de extracto, que siempre es un factor limitante. Las reacciones para este tipo de amplificación se realizaron en 50µl usando 1µl de extracto y tampón 1X de PCR (16'6mM (NH₄)SO₄, 67mM Tris-HCl pH 8'8), 3mM de MgCl₂, 0'2mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 10µg de BSA (albúmina de suero bovino), 50pmol del cebador y 2U de EcoTaq ADN polimerasa (Ecogen).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) bajo las siguientes condiciones: 95°C durante 2 min., a continuación 50 ciclos de 37°C 1 min.; rampa de Δ1°C/10 seg. desde 37°C hasta 55°C; 55°C 1 min.; 92°C 30 seg. y una extensión final de 5 min. a 72°C. También se han usado las mismas condiciones que en Pusch y col. (2000): 94°C durante 3 min. seguidos de 5 ciclos de 94°C 30 seg., 60°C 30 seg., 72°C 1 min.; 5 ciclos de 94°C 30 seg., 57°C 30 seg., 72°C 30 seg., 25 ciclos de 94°C 15 seg., 52°C 15 seg., 72°C 15 seg. y por último una extensión de 72°C durante 5min.

Una vez terminada la amplificación se utilizaron 7µl de la reacción como molde para la amplificación específica.

4.2. Purificación de los productos de amplificación.

Dado el pequeño tamaño de los productos amplificados se utilizó acetato amónico para su purificación siguiendo el protocolo detallado en Maniatis y col. (1982):

- Se añaden 30µl de acetato amónico 7'5M a las mezclas de PCR.
- Se añaden 80µl de isopropanol y se dejan los tubos durante 1 hora en hielo prensado.
- Se centrifuga durante 15 min. a 13.000 rpm.
- Se lava el precipitado con 150µl de etanol al 70% y se centrifuga durante 5 min. a 13.000 rpm.
- Se deja secar el precipitado en una estufa a 37°C.
- Se resuspende en 6µl de agua estéril y 6µl de TE.

4.3. Clonaje de los productos de amplificación.

En el caso de los fragmentos obtenidos de los dientes aborígenes y en aquellos fragmentos en los que se observó una leve contaminación en la amplificación, se procedió al clonaje de dichos productos. Este se llevó a cabo utilizando el pGEM[®]-T Vector System de Promega según el siguiente protocolo:

4.3.1. Reacción de ligado del pGEM[®]-T con el producto de PCR.

Estas reacciones se realizaron en volúmenes de 5µl que contienen:

- 1'5µl de producto de PCR previamente purificado.
- 2'5µl de tampón 2X (60mM Tris-HCl, pH 7'8, 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 1mM ATP, 10% PEG) suministrado por Promega.
- 0'5µl de T4 DNA ligasa.
- 0'3µl del vector pGEM[®]-T.
- 0'2µl de agua estéril.

Las reacciones se mezclaron bien con la pipeta y se incubaron a 4°C durante toda la noche.

4.3.2. Transformación de células JM109 con las reacciones de ligado.

El protocolo de transformación se realizó según las recomendaciones de la casa comercial:

- Se centrifugan los tubos con las reacciones de ligado y se añaden 4µl a un tubo de 1'5ml estéril en hielo.
- Se descongelan las células competentes JM109 (suministradas por Promega) y se mezclan agitando suavemente el tubo.
- A continuación se transfieren cuidadosamente 20µl de células a cada tubo con reacción de ligado.
- Se homogeneiza la mezcla y se deja en hielo prensado durante 20 min.
- Pasado este tiempo, las células se someten a un choque térmico a 42°C durante 45-50 seg., para permitir la entrada del ADN a la célula, y se devuelven los tubos a hielo inmediatamente durante 2 min.

-Se añade 950µl de medio SOC (50mg/ml LB, 20mM Mg⁺², 20mM glucosa; 2'5mM KCl) a cada tubo con las células transformadas y se incuba 1 hora y media a 37°C con agitación.

-A continuación se transfieren 150µl de estas células transformadas a una placa de LB/ampicilina/IPTG/X-Gal y se incuban a 37°C durante 16-24 horas.

4.3.3. Selección de colonias con inserto.

Una vez crecidas las colonias se seleccionaron las de color blanco frente a las de color azul, ya que las primeras son las que contienen el fragmento de interés. Estas colonias se picaron con un palillo estéril y se introdujeron en un tubo de 1'5ml que contenía 10µl de TE. De ahí se cogieron 1'5µl para una amplificación usando los cebadores universales de M13 para comprobar que, efectivamente, hemos seleccionado colonias con inserto. Estas amplificaciones se realizaron en volúmenes de 10µl siendo la composición de la mezcla la siguiente: tampón 1X de PCR (16'6mM (NH₄)SO₄, 67mM Tris-HCl pH 8'8), 2'5mM de MgCl₂, 0'2mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 1pmol de cada cebador, 0'25U de Ecotaq ADN polimerasa (Ecogen).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 3 min., a continuación 35 ciclos de 94°C 15 seg.; 58°C 15 seg.; 72°C 15 seg. y una extensión final de 5 min. a 72°C.

Los productos de amplificación se comprobaron mediante separación electroforética en geles de agarosa al 1'7%, tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV.

4.3.4. Extracción de plásmidos.

Aquellas colonias que contienen plásmido con inserto se crecieron en tubos de cristal de 15ml, con 2ml de medio LB y 100µg de ampicilina, a 37°C con agitación durante toda la noche. Una vez crecidas las células, se procede a la extracción del plásmido con el protocolo de lisis alcalina (Maniatis y col., 1982), que se detalla a continuación:

- Se llena un tubo eppendorf con aproximadamente 1'5ml de cultivo y se sedimentan las células mediante centrifugación a 13.000 rpm. durante 1 min.
- Se elimina el líquido sobrenadante y se resuspenden las células en 100µl de solución 1 (glucosa 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM pH 8) con un "Vortex".
- Se añaden 200µl de solución 2 (NaOH 0'2N, SDS 1%) y se deja a temperatura ambiente durante 5 min.
- A continuación se añaden 150µl de AcK 3M pH 5 y se incuban los tubos en hielo durante 10 min.
- Pasado este tiempo se centrifuga durante 10 min. a 13.000 rpm., se recoge el sobrenadante, se pasa a un tubo eppendorf limpio, que contiene 300µl de fenol y 300µl de cloroformo, y se agita.
- Se centrifuga durante 5 min. a 13.000 rpm., se recoge el sobrenadante y se pasa a un tercer tubo eppendorf que contiene 400µl de isopropanol.
- A continuación se deja en hielo prensado durante 30 min. y luego se centrifuga a 13.000 rpm durante 15 min.
- Se elimina el líquido con una pipeta Pasteur, se añaden 500µl de etanol al 70% y se centrifuga a 13.000 rpm. durante 5 min.
- Se elimina el líquido nuevamente con una pipeta Pasteur, se deja secar el precipitado 10 min. en una estufa a 37°C y, por último, se resuspende el precipitado en 25µl de agua estéril y 25µl de TE.

4.4. Secuenciación de productos amplificados y clones.

Tanto los productos amplificados y purificados como los clones fueron secuenciados directamente usando el fmol[®] DNA Sequencing System de Promega. En el caso de los productos purificados se usaron los mismos cebadores que en sus respectivas amplificaciones, y para los clones los cebadores universales de M13. Todos los cebadores usados fueron marcados con el isótopo radiactivo ($\gamma^{32}\text{-P}$) ATP en el extremo 5'.

4.4.1. Reacción de marcado de cebadores.

Para cada cebador la reacción fue la siguiente:

-A tubos de microcentrífuga de 0'5ml se les añadieron:

Cebador	10pmol
(γ^{32} -P) ATP	10pmol
T10X de T4 Polinucleótido Kinasa	1 μ l
T4 Polinucleótido Kinasa (5-10U/ μ l)	1 μ l
Agua estéril	Hasta 10 μ l

-Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y después a 90°C durante 2 minutos para inactivar la kinasa.

-A continuación se centrifugó brevemente para recoger los restos de condensación y finalmente se almacenó a -20°C hasta su utilización.

4.4.2. Reacciones de extensión y terminación.

Estas reacciones se prepararon de la misma forma, tanto para los fragmentos amplificados como para los clones.

-Para cada reacción de secuenciación, se usan 4 tubos de microcentrífuga de 0'5ml de diferentes colores: rojo (guanina), azul (adenina), amarillo (timina) y verde (citosina). A cada tubo se le añade 1 μ l de una mezcla de dNTP/ddNTP del didesoxinucleótido correspondiente y se mantiene en hielo hasta su uso.

-Para cada reacción de las anteriores se prepara la siguiente mezcla:

ADN molde	4'5 μ l
T5X de secuenciación fmol [®]	2'5 μ l
Cebador marcado	0'5 μ l
Agua estéril	2 μ l
Taq ADN polimerasa de secuenciación (5U/ μ l)	0'25 μ l

-Se añaden 2'3 μ l de la mezcla, obtenida en el punto anterior, a cada tubo con los dNTP/ddNTP.

-Se centrifugan los tubos hasta llegar a 13.000 rpm, se colocan las muestras en el termociclador y se inicia la reacción de la polimerasa, que se realiza en las mismas condiciones que la amplificación del fragmento a secuenciar.

-Terminada la reacción, se añaden 2 μ l de una solución de "parada" (1mM EDTA pH 8, 1mg/ml de azul de bromofenol, 1mg/ml de xilenocianol en N,N-dimetilformamida) a cada tubo.

-A continuación, se desnaturalizan las muestras a 96°C durante 2 minutos y se introducen rápidamente en hielo prensado. Se conservan a -20°C hasta su utilización.

4.4.3. Electroforesis de los productos de secuenciación.

Los productos de las reacciones de secuenciación se separan mediante electroforesis vertical en condiciones desnaturalizantes, empleando secuenciadores manuales Owl Scientific (modelo S4S), usando geles de 41x33 cm de superficie y 0.4 mm de grosor. Uno de los dos cristales utilizados como molde para la fabricación de estos geles se trata, en la cara que entra en contacto con el mismo, con dicloro-dimetil-silano (Sigma) al 5% en cloroformo. Este tratamiento facilita su separación del gel tras la electroforesis. La mezcla de poliacrilamida al 6%, conteniendo urea a una concentración 7M, se prepara de la siguiente manera:

Acrilamida	28'5g
N,N'-metilen-bisacrilamida	1'5g
Urea	210g
TBE 10X	50ml
TEMED	175µl
Agua estéril	Hasta 500ml

Tras su homogeneización la solución se filtra usando una bomba de vacío y filtros Millipore (tipo HA).

Cada gel se prepara con 60ml de la mezcla descrita tras añadirle 380µl de peroxidisulfato de amonio (100mg/ml) para inducir la reacción de polimerización. Conseguida ésta, los geles se montan en los secuenciadores verticales, añadiendo 500ml de tampón TBE 1X tanto en la cubeta superior, anódica, como en la inferior, catódica, del aparato. Antes de cargar las muestras, los geles se precalientan durante 1 hora, suministrándoles corriente eléctrica a una potencia constante de unos 120W (1800V, 75mA). Posteriormente se coloca un peine de “dientes de tiburón” en contacto con el gel y se cargan las reacciones de cada muestra en el siguiente orden: guanina (G), adenina (A), timina (T) y citosina (C), dejando un pocillo vacío como separación entre muestras. Las electroforesis transcurren bajo las mismas condiciones que el periodo de calentamiento de los geles.

Tras las electroforesis, se separan los cristales con una espátula y el gel se adhiere a láminas de papel de filtro, y se transfiere a secadores Drygel Sr. (SE 1160) donde se seca, a 80°C, aplicando vacío durante 2 horas. Posteriormente se pone en

contacto directo con películas radiográficas durante 1-4 días. Las secuencias se visualizan en un transiluminador tras el revelado fotográfico de estas películas.

5. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE RESTRICCIÓN DEL ADN_{mt}.

Como complemento a las secuencias de la región hipervariable I (RHVI) del ADN mitocondrial, se han analizado varios polimorfismos de restricción haplogrupo-específicos. Este estudio se muestra valioso por dos razones principales: por un lado, nos permite confirmar la correcta asignación a los haplogrupos de los linajes obtenidos por secuenciación, incluso de aquellos individuos para los que no se ha obtenido la secuencia completa; por otro, al tratarse de regiones distintas de la RHVI, es improbable que una contaminación esporádica dé el mismo resultado en ambas, confirmando así la correcta secuencia de cada diente.

La metodología básica para determinar estos polimorfismos requiere una amplificación por PCR del fragmento que incluye la posición variable y una posterior digestión con la endonucleasa de restricción correspondiente. Mediante el uso del programa informático Generunner ver. 3.0 (Hastings Software, Inc.), se localizaron las dianas de restricción incluidas en cada producto de amplificación y se calcularon los tamaños de los fragmentos obtenidos tras la digestión. En la tabla 3 se muestran los cebadores empleados, la temperatura utilizada en el ciclo de anillamiento, así como el tamaño del fragmento amplificado en cada caso.

Tabla 3. Se muestra la secuencia de las parejas de cebadores (numeración se corresponde con la de Anderson y col. (1981)), la temperatura de anillamiento de PCR y el tamaño del producto de amplificación.

Cebadores (5'→3')	Temp (°C)	Tamaño	Pos. variable
L6977 GGCCTGACTGGCATTGTATTA H7052 TGATGGCAAATACAGCTCCT	45	115	7025
L12253 ATGCCCCCATGTCTAACAAC T9 ¹ ATTACTTTTATTTGGAGTTGCACCAAGATT	48	105	12308
L3557 GCTCTCACCATCGCTCTTCT H3623 GGCTAGGCTAGAGGTGGCTA	45	105	3592
L4210 ² CCACTCACCTAGCATTACTTA H4227 ² ATGCTGGAGATTGTAATGGGT	52	59	4216

¹Torroni y col (1996); ²Maca-Meyer y col. (2001).

Las reacciones de amplificación se prepararon en volúmenes de 10µl y constaron de 2µl de ADN molde, tampón 1X de PCR (16'6mM (NH₄)SO₄, 67mM

Tris-HCl pH 8.8), 2.5mM de MgCl₂, 1pmol de cada cebador, 0.2mM de cada desoxinucleótido trifosfato, y 0.35U de Ecotaq ADN polimerasa (Ecogen) Estas reacciones se amplificaron en un ciclador térmico PTC-100 (MJ Research) con el siguiente programa:

- ◆ 94°C durante 2 min, seguidos de 35 ciclos de
- ◆ 94°C durante 5-10 seg; 45-52°C durante 5-10 seg; 72°C durante 5-10 seg.
- ◆ 72°C durante 5 min.

Tras la amplificación, los productos se digirieron directamente con la endonucleasa de restricción correspondiente. Estas digestiones se realizaron en volúmenes de 15µl, mezclando 10µl de producto de amplificación con el tampón adecuado para la enzima y 1U de la endonucleasa de restricción correspondiente. A continuación, las digestiones se incubaron en un baño a 37°C durante 2 horas. Transcurrido este periodo, se añadió solución de carga y se corrió la totalidad del volumen en geles de poliacrilamida nativa del 6-8% en tampón TBE 1X, a 30V/cm durante 20 min., seguido de 15 min. de tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV.

En los siguientes apartados se ha tomado la Secuencia de Referencia de Cambridge (CRS) (Anderson y col., 1981; Andrews y col., 1999) como el estado ancestral, y las mutaciones con respecto a ésta, como estados derivados.

5.1. Polimorfismo *AluI* 7025.

Este polimorfismo es el que determina la pertenencia o no al haplogrupo H, mayoritario en todas las poblaciones Europeas. Se debe a una transición C→T en la posición 7028 que crea una diana *AluI* (AG↓CT). De esta forma, los individuos pertenecientes al haplogrupo H (estado ancestral) mostrarán ausencia de corte, mientras que los cortados, pertenecerán a haplogrupos diferentes.

Para detectar esta posición variable, se amplifica un fragmento de 115pb, utilizando la pareja de cebadores L6977/H7052, en una reacción de 10µl. El programa de amplificación fue de 35 ciclos a 94°C durante 10 seg., 45°C durante 10 seg. y 72°C durante 10 seg. Los productos de amplificación fueron digeridos directamente con la enzima *AluI* en reacciones de 15µl que constaron de: 10µl de producto amplificado, 1.5µl de tampón One-Phor-All Buffer PLUS (OPA)

(Pharmacia) y 1U de enzima *AluI* (Boehringer Mannheim, 239275). Tras, al menos, 2 horas de incubación a 37°C, se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida nativa al 6% (29:1).

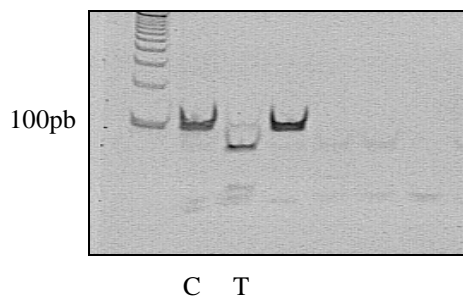


Fig. 7. Patrón de bandas observado tras la digestión con *AluI*. C→ Estado ancestral (H); T→ Estado derivado

Debido a que el fragmento presenta otra diana *AluI*, incluida en el cebador H7052, cuando la muestra presenta una C en la posición 7028 (estado ancestral→haplogrupo H) se observan 2 bandas de 15 y 100pb, mientras que si presenta una T (estado derivado) se observan 3 bandas de 70, 30 y 15pb (Figura 7). La secuencia del fragmento amplificado se muestra a continuación: en negrita las zonas de unión de los cebadores, en color las dianas reconocidas por la enzima *AluI* y en mayúscula la base polimórfica.

ggcctgactggcattgtattagcaaactcatcactagacatcgtactacacgacacgtactacggttagcCcaactcca
ctatgcctatcaat**aggagctgatttgccatca**

5.2. Polimorfismo *HinfI* 12308.

Este polimorfismo determina la pertenencia o no a la rama de los haplogrupos U y K. Este polimorfismo se debe a una transición A→G en la posición 12308, sin embargo no existe ninguna restrictasa que reconozca esa secuencia. Por este motivo, se utilizó un cebador modificado en la cuarta base anterior al extremo 3' (cambio de una T por una C) (Torrioni y col., 1996) que, al incorporarse en la secuencia amplificada crea una diana potencial para la enzima *HinfI* (G↓ANTC) si, además, existe la mutación. Para la amplificación, se utilizó la pareja de cebadores L12253/T9 que generan un fragmento de 105pb. El programa de amplificación fue de 35 ciclos a 94°C durante 10 seg., 48°C durante 10 seg. y 72°C durante 10 seg. Los productos de amplificación se digirieron directamente en reacciones de 15µl con 10µl del producto, 2µl de tampón OPA (Pharmacia) y 1U de enzima *HinfI* (NEB

155S). Tras, al menos, 2 horas de digestión en un baño a 37°C se añadieron 3µl de tampón de carga y se corrió el total del volumen en geles de poliacrilamida al 6% (29:1) en las condiciones ya descritas.

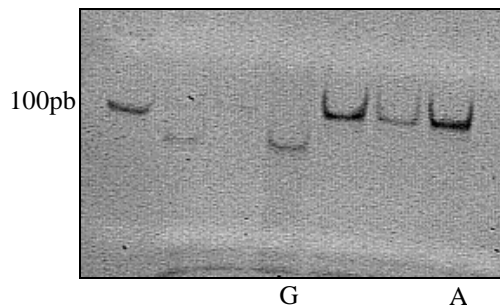


Fig. 8. Patrón de bandas observado tras la digestión de las muestras con *HinfI*. A→ Estado ancestral; G→ Estado derivado (U/K)

Cuando la muestra tiene una A en la posición 12308 (estado ancestral), se observa un fragmento de 105pb sin digerir, mientras que cuando la posición muta hacia una G (estado derivado) se obtienen 2 fragmentos de 75 y 30pb (Figura 8). A continuación se muestra la secuencia de ADN amplificada: en negrita las zonas de unión de los cebadores, en color fucsia la diana reconocida por *HinfI*, en azul la base incorporada por el cebador y en mayúscula la posición variable.

atgccccatgtctaacaacatggctttctcaacttttaaaggataacagctatccattggtcttagccccaAaatcttg
gtgcaactc caaataaaaagtaat

5.3. Polimorfismo *HpaI* 3592.

La pertenencia de una muestra a los haplogrupos africanos L1 y L2 se determina por este polimorfismo. Una transición C→T en la posición 3594, que genera una diana *HpaI* (GTT↓AAC), está presente en dichos haplogrupos. Mediante el diseño de los cebadores específicos L3557 y H3623, se pudo obtener un fragmento de 105pb que contenía esta posición. Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 10µl, utilizando el siguiente programa de amplificación: 35 ciclos de 94°C 10 seg., 45°C 10 seg. y 72°C 10 seg. Las reacciones de PCR se digirieron directamente en volúmenes de 15µl con 10µl de producto amplificado, 1'5µl de tampón OPA (Pharmacia) y 1U de enzima *HpaI* (Boehringer Mannheim, 380385). Tras, al menos, 2 horas de

incubación a 37°C, se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida nativas al 6% (29:1), bajo las condiciones ya descritas.

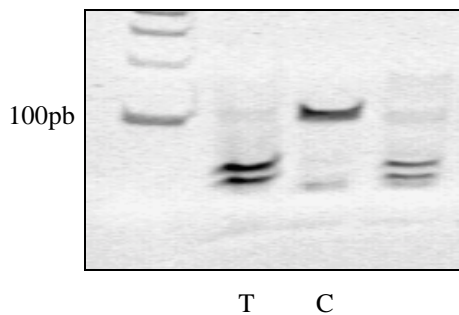


Fig. 9. Patrón de bandas observadas tras la digestión de las muestras con *HpaI*. T→ Estado derivado (L1/L2); C→ Estado ancestral.

Aquellas muestras pertenecientes a los haplogrupos L1 y L2, mostrarán una T en la posición 3594 (estado derivado), generándose una diana *HpaI* y, por tanto, se observarán 2 bandas de 48 y 57pb. En cambio, aquellas muestras que presenten el estado ancestral (C), no mostrarán corte y sólo tendrán una banda de 105pb (Figura 9). A continuación se muestra la secuencia del fragmento amplificado: en negrita la zona de unión de los cebadores, en color la diana reconocida por la enzima *HpaI* y en mayúscula la posición variable.

gctctcaccatcgctcttctactatgaacccccctccccatacccaacccccctgtCaacctcaacctaggcctctattta
ttctagccacctctagcctagcc

5.4. Polimorfismo *NlaIII* 4216.

Este polimorfismo determina la pertenencia al superhaplogrupo J/T. Se caracteriza por una transición T→C en la posición 4216 que genera una diana para la endonucleasa de restricción *NlaIII* (CATG↓) en estos individuos. Para determinar el estado de esta posición en las muestras, se utilizó la pareja de cebadores L4210/H4227 que generan un producto de 59pb. Las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes de 10µl con un programa de 35 ciclos de 94°C durante 5 seg., 52°C durante 5 seg. y 72°C durante 5 seg. Los productos de amplificación fueron digeridos directamente con la restrictasa *NlaIII* en reacciones de 15µl que constaron de: 10µl de la muestra, 1'2µl de tampón 4 de New England Biolabs (NEB) y 1U de enzima *NlaIII* (NEB R125S). Tras, al menos, 2 horas de incubación a 37°C

se añadieron 3µl de solución de carga y el total del volumen se corrió en geles de poliacrilamida al 8% (29:1) en las condiciones descritas.

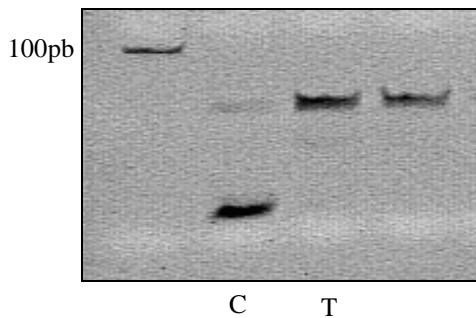


Fig. 10. Patrón de bandas observado tras la digestión de las muestras con *NlaIII*. C→ Estado derivado (J/T); T→ Estado ancestral.

Aquellas muestras pertenecientes a los haplogrupos J o T presentarán una C en la posición 4216 (estado derivado), por lo que la enzima cortará observándose 2 fragmentos de 31 y 28pb (realmente sólo se observa una banda). Aquellos individuos pertenecientes a otros haplogrupos presentarán una T (estado ancestral), por lo que sólo se observará la banda correspondiente al fragmento sin digerir, de 59pb (Figura 10). A continuación se muestra la secuencia del fragmento amplificado: en negrita la zona de unión de los cebadores, en color la diana reconocida por la enzima *NlaIII* y en mayúscula la posición variable.

ccactcacctagcattacttatatgaTatgtctccataccattacaatctccagcat

6. DETERMINACIÓN DEL SEXO DE LOS INDIVIDUOS.

La determinación del sexo de muestras arqueológicas es importante para la investigación de la estructura demográfica en poblaciones humanas antiguas (Ovchinnikov y col., 1998). Sin embargo, en casos de restos fragmentados o de niños es casi imposible su determinación a escala antropológica. Han sido muchos los métodos moleculares desarrollados para la determinación del sexo utilizando la PCR (Nakahori y col., 1991a; Akane y col., 1992). Sin embargo, estos protocolos no suelen ser factibles para el ADN antiguo, ya sea por requerir la amplificación de fragmentos demasiado grandes, o porque depende de la presencia/ausencia de un elemento específico del cromosoma Y (Hummel y Herrmann, 1991). Obviamente, la presencia de producto tras la amplificación de un elemento específico del cromosoma Y, indica que el sujeto es varón. Sin embargo, su ausencia podría indicar que se trata

de una hembra o que la amplificación no ha tenido éxito. Por ello, los últimos estudios se han dirigido al gen de la *Amelogenina* (AMG) que se encuentra en los cromosomas X e Y, ya que ofrece la ventaja de un control positivo interno. El alelo del cromosoma Y contiene varias variaciones en su primer intrón, incluyendo una deleción de 189pb (Nakahori y col., 1991b), sin embargo este análisis requiere tamaños de amplificación inapropiados para el ADN antiguo. Para los estudios con ADN antiguo se está utilizando una región en la que existe una deleción de 6pb en el intrón 1 del gen homólogo en el cromosoma X, región en la que nos hemos centrado también en este trabajo (Sullivan y col., 1993; Béraud-Colomb y col., 1995; Faerman y col., 1995; Stone y col., 1996; Ovchinnikov y col., 1998). Para ello, en un principio se utilizaron los cebadores publicados por Sullivan y col. (1993) que dan productos de amplificación de 106 y 112pb para los cromosomas X e Y, respectivamente. Estos son:

Amel-A 5' CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG 3'

Amel-B 5' ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG 3'

Sin embargo, la experiencia con estos cebadores fue negativa, por lo que se mantuvo el cebador Amel-A y se diseñó un tercer cebador de tal forma que el producto de amplificación fuese más pequeño (60 y 66pb para los cromosomas X e Y, respectivamente). La secuencia de este cebador es:

Amel-C 5' AATRYGGACCACTTGAGAAAC 3'

Donde R= A/G, Y=C/T

Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 10µl que contenían 6'8µl de ADN molde, tampón 1X de PCR (16'6mM (NH₄)SO₄, 67mM Tris-HCl pH 8'8), 5mM de MgCl₂, 1pmol de cada cebador, 0'2mM de cada desoxinucleótido trifosfato y 0'35U de Ecotaq ADN polimerasa (Ecogen). Las reacciones se amplificaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research) con el siguiente programa: 40 ciclos de 94°C durante 10 seg., 45°C durante 10 seg. y 72°C durante 10 seg. Tras la amplificación, se añadieron 2µl de tampón de carga y se corrió el volumen entero en geles de poliacrilamida al 8% (29:1) a 30V/cm durante 20 min (Figura 11).

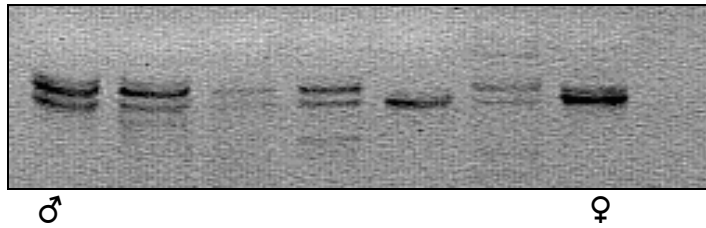


Fig. 11. Patrón observado tras la amplificación con la pareja de cebadores AmelA/AmelC. Los machos se distinguen por la presencia de 2 bandas de 60 y 66pb, mientras que las hembras sólo muestran la banda de 60pb. Los canales ♀ y ♂ corresponden a marcadores obtenidos, tras la amplificación con los mismos cebadores, de muestras actuales. Estos marcadores se sintetizaron en espacio y tiempo distinto al de las muestras antiguas.

7. PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN.

Probablemente uno de los mayores problemas a la hora de trabajar con ADN antiguo es la contaminación, que además puede surgir en varios puntos del proceso. La muestra puede contaminarse después de la muerte o durante la posterior manipulación de los restos. También se puede contaminar durante el proceso de extracción o por medio de los reactivos de PCR, material o personal del laboratorio (Austin y col., 1997b). Por tanto, lo más importante a la hora de trabajar con ADN antiguo es seleccionar muestras que tengan una alta probabilidad de contener ADN, tomar las medidas oportunas para reducir los riesgos de contaminación y establecer una metodología para la autenticación de cualquier ADN que se recupere. A este respecto, recientemente se han establecido nueve “criterios” a seguir cuando se realicen trabajos de ADN antiguo (Cooper y Poinar, 2000). Estos son:

1. Áreas de trabajo físicamente separadas.
2. Controles de extracción y de amplificación.
3. Comportamiento molecular adecuado.
4. Reproducibilidad.
5. Clonaje.
6. Replicación independiente.
7. Preservación bioquímica.
8. Cuantificación
9. Restos asociados.

La mayoría de estos criterios se han cumplido durante el desarrollo de este trabajo y se expondrán a continuación. Sin embargo, unos pocos no se han llevado a cabo por parecernos innecesarios en nuestro caso y/o por no contar con las instalaciones necesarias para llevarlos a cabo. Estos criterios se discutirán más adelante.

7.1. Area de trabajo y material.

Todo el trabajo con material antiguo se ha realizado en una unidad físicamente separada del laboratorio general, en un piso distinto del edificio, en el que nunca se había extraído ni amplificado ADN. Este cuarto está permanentemente iluminado con luz UV, excepto cuando está en uso (Fox y col., 1991). Todas las superficies de trabajo se han limpiado regularmente con lejía (Prince y Andrus, 1992). Las extracciones de ADN antiguo, así como la preparación de las reacciones de PCR, se hacían separadas en el tiempo y siempre en una campana de flujo laminar que también estaba constantemente iluminada con luz UV. Además, se contó con juegos de pipetas exclusivos, unas dedicadas a las extracciones y otras para las reacciones de PCR. Siempre se usaron puntas protegidas estériles (TipOne, Star Lab). Durante la permanencia en este cuarto, el uso de guantes estériles, gorro, mascarilla bucal y bata fue norma. Con respecto al material metálico (placas y pinzas utilizadas en la extracción), después de cada uso, se limpiaba bien con etanol, se envolvía en papel de aluminio y se esterilizaba en un horno a 200°C durante al menos 2 horas. Al comienzo del trabajo, se comprobó la efectividad de esterilización del horno al incluir un papel impregnado en una solución de ADN, del que posteriormente no se pudo amplificar ADN mitocondrial. Otro papel sirvió de control, y se amplificó ADN eficientemente. Las soluciones empleadas, en la mayoría de los casos, fueron adquiridas comercialmente; de lo contrario se autoclavaron varias veces y se trataron con luz UV antes de su uso. Los reactivos de PCR se alicuotearon en viales, de tal forma que fuesen de un único uso. Además, se irradiaban con luz UV antes de utilizarlas. En este punto cabe mencionar que, aunque se ha descrito que la irradiación con luz UV del material plástico puede inhibir la PCR (Burgess y Hall, 1999), nuestra experiencia no ha confirmado esta inhibición a los niveles de irradiación empleados. Con respecto al material fungible, siempre se utilizó estéril y desechable.

7.2. Controles.

El primer control realizado fue la comprobación de que el tratamiento descontaminante que se hace al diente realmente elimina todo el ADN exógeno que pudiera haber en la superficie. Este control fue hecho en estudios preliminares de ADN antiguo por Rando (1998) consistiendo, básicamente, en la contaminación del diente con ADN de gallina, tratamiento descontaminante del mismo y posterior amplificación por PCR utilizando cebadores específicos del citocromo b de gallina. De esta forma, por ausencia de amplificación, se pudo comprobar que el tratamiento eliminaba completamente el ADN de gallina, mostrándose efectivo.

Los demás controles se realizaron rutinariamente a lo largo del trabajo. El primero es el que se conoce como *control de extracción*, que se procesa en paralelo con el diente pero que no contiene muestra (Hagelberg y col., 1989; Pääbo y col., 1989). De esta forma, cualquier resultado positivo observado en este control implica una contaminación en la fase de extracción, ya sea proveniente de alguno de los reactivos usados, o de la manipulación durante el proceso. Otra serie de controles son los llamados *controles negativos de PCR*. Esos controles se incluyen durante la preparación de las reacciones de PCR y contienen todos los reactivos de PCR pero el extracto se sustituye por agua. Rutinariamente se incluyeron 3 controles negativos por amplificación, para aumentar la probabilidad de detectar cualquier tipo de contaminación. En el caso de que apareciese algún resultado positivo en cualquiera de los tres controles, se tiraban los reactivos y se repetía la amplificación.

7.3. Comportamiento molecular apropiado.

Debido al estado, normalmente fragmentado, que presenta el ADN antiguo, obtener productos de PCR mayores de 500pb es improbable. De esta forma, esperamos encontrar una correlación inversa entre el tamaño del producto y la eficiencia de amplificación (Hagelberg y col., 1991; Handt y col., 1994b; Hummel y col., 1999; Adcock y col., 2001). Si esto no se cumple, probablemente se trate de una contaminación con ADN contemporáneo.

7.4. Reproducibilidad.

Esto significa que los resultados obtenidos de dos muestras de un mismo individuo tienen que ser iguales. Desgraciadamente en nuestro caso, debido a la naturaleza de nuestras muestras (normalmente se trataban de dientes sueltos), esto no fue posible más que en unos pocos casos, en los que tuvimos acceso a fragmentos de mandíbula con más de un diente.

7.5. Clonaje.

El clonaje de los productos amplificados se realizó rutinariamente, sobre todo en los casos de contaminación. Así, se clonaron tanto los fragmentos como los controles y se secuenciaron como mínimo tres clones de cada uno. Esta es una forma de “salvar” una muestra, en el sentido de que si la secuencia obtenida en el control es distinta a la obtenida en el diente, podremos fiarnos de que la contaminación no ha afectado al diente. En caso contrario, la secuencia obtenida del diente se desecha.

8. FILOGENIA DE LOS LINAJES U6.

Los linajes pertenecientes al sub-haplogrupo U6 son de especial interés en el Archipiélago, debido a que un sub-grupo del mismo se encuentra específicamente en las Islas, siendo un posible nexo de unión entre ellas y el continente Africano. Por esta razón, nos ha parecido interesante estudiar este sub-haplogrupo en detalle, por un lado relacionando todas las secuencias de la RHVI publicadas, y por otro, secuenciando el genoma mitocondrial completo de varios individuos, pertenecientes al U6, con haplotipos divergentes.

8.1. Análisis de la RHVI de linajes U6.

Para este análisis, se han tomado los 44 haplotipos distintos pertenecientes al sub-haplogrupo U6 de la bibliografía y se han relacionado filogenéticamente mediante el uso de las redes abreviadas promedio (Bandelt y col., 1999). Los linajes y procedencia de los individuos utilizados se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Haplotipos del U6 y procedencia de los individuos que los muestran.

Secuencia HVRI	Procedencia¹
172 219	1 MOR
172 219 278	2 JAS; 1 AZO; 1 PAL; 1 CAR; 1 MAD; 2 AND; 1 BMO; 2 BEM; 6 MAU; 2 SAH; 1 CAN
172 219 311	1 AZO; 1 PN; 1 GAL; 1 BMO
189 219 278	1 SEW
092 172 219 278	2 AZO; 1 CAV; 1 MAU; 3 MOR; 1 CAN
129 172 219 311	1 CAR
134 172 219 278	1 IRQ
163 172 219 311	1 AND; 26 CAN
172 174 219 311	1 BIF; 1 AND; 4 MRG
172 189 219 278	2 SON; 1 FUL; 2 KIK; 3 BIF; 1 EGY; 2 SYR; 2 PCR; 1 BMP; 3 MAU; 2 MOR; 1 BMO; 10 BAL; 1 SEM; 2 PN; 1 ETI; 1 SIC; 1 CAN
172 193 219 311	1 SEW
172 219 235 278	1 GAL; 1 MOR
172 219 261 311	1 AZO; 1 MDC; 1 PN
172 219 271 278	1 PN
172 219 278 294	1 BIF
172 219 278 311	1 BIF
172 219 278 327	1 SAT
189 219 278 297	1 BMO
092 163 172 219 311	9 CAN
092 129 163 172 219 311	1 CAN
093 172 189 219 278	1 JET
111 172 219 311 362	2 ABD
129 163 172 219 311	1 CAN
145 172 219 235 278	2 AND; 1 BAL
147 172 189 219 278	1 SYR
163 164T 172 219 311	1 PCR; 2 CAN
172 173 189 219 278	1 BIF
172 174 188 219 311	1 PN
172 189 192 219 278	1 BMO
172 189 219 222 278	1 BAL
172 189 219 235 278	1 BMO
172 189 219 239 278	1 BIF; 1 AND; 1 LEO; 1 SAN; 1 MOR; 11 BAL; 1 SAH
172 189 219 278 295	1 BIF; 1 BMO
172 189 219 278 311	1 JBU; 1 ETI; 2 AND; 1 TUA
172 219 235 278 355	2 PN; 1 PC
172 219 278 290 311	1 MAU; 1 CV
129 163 164T 172 219 311	1 GAL
145 172 219 235 278 311	1 BMO
172 184 189 219 278 354	1 ETI
172 189 219 239 278 311	1 BAL
172 189 219 239 278 362	2 PC
111 172 189 219 278 293 362	1 BMO
158 172 189 219 278	1 BRA
172 189 219 278 293 362	3 BRA

¹MAU: Mauritania, MOR: Marruecos, SAH: Sáhara, SEW: Senegal-Wolof (Rando y col., 1998); BIF: Bereberes de Ifane, ETI: Etiopía, JAS: Judíos Ashkenazic, JBU: Judíos de Bukharan, JET: Judíos de Etiopía (Thomas y col., 2002); IRQ: Iraq, MdC: Mediterráneo Centro, PAL: Palestina, SYR: Siria (Richards y col., 2000); CAR: Cataluña-Aragón (Crespillo y col., 2000); AND: Andalucía, CV: Cabo Verde, MAD: Madeira, SAN: Santander (Larruga, comunicación personal); BMO: Bereberes de Marruecos (Rando y col., 1998; Brakez y col., 2001; Larruga, comunicación personal); CAN: Canarias (Rando y col., 1999); AZO: Azores (Santos, comunicación personal); PN: Portugal Norte (Pereira y col., 2000; González y col., 2002); GAL: Galicia (Salas y col., 1998; González y col., 2002); CAV: Castilla, LEO: León, MRG: Maragatos (Larruga y col., 2001); FUL: Fulbe, KIK: Kikuyu, SON: Songhai, TUA: Tuareg (Watson y col., 1997); EGY: Egipto (Krings y col., 1999b); BAL: Bereberes de Argelia, PCR: Portugal (Côte-Real y col., 1996); SEM: Senegal-Mandenka (Graven y col., 1995); SIC: Sicilia (Cali y col., 2001); SAT: Sao Tomé (Mateu y col., 1997); ABD: Beduinos Árabes (Di Rienzo y Wilson, 1991); PC: Portugal Centro (González y col., 2002); BRA: Brazil (Alves-Silva y col., 2000).

8.2. Análisis de linajes completos del U6.

La secuenciación completa de distintos linajes del sub-haplogrupo U6, pertenecientes a individuos de diversa procedencia geográfica, nos va a permitir relacionarlos filogenéticamente y estimar sus edades de coalescencia. De esta forma, podremos saber cuál de los dos sub-grupos, U6a o U6b, es el más antiguo.

Para ello, hemos elegido 9 individuos pertenecientes al sub-haplogrupo U6 con distintos motivos en su RHVI. En la tabla 5, se detalla la procedencia de cada individuo así como su secuencia en la RHVI.

Tabla 5. Procedencia y secuencia de la RHVI de los 9 individuos utilizados en la secuenciación completa de su ADNmt.

PROCEDENCIA (CÓDIGO)	SECUENCIA RHVI
Marruecos ¹ (Mor-1)	172 219
Mauritania (Mau-1)	172 219 278
Bereber (Ber)	172 219 311
Galicia (Gal)	051 172 219 311
La Palma (Can)	163 172 219 311
Maragato (Mag)	172 174 219 278
Wolof (Wol)	172 193 219 311
Marruecos (Mor-2)	172 189 219 239 278
Mauritania (Mau-2)	172 189 219 278 399

¹Maca-Meyer y col. (2001).

8.2.1. Análisis de restricción de los linajes U6.

Los individuos utilizados para el estudio del sub-haplogrupo U6 fueron analizados para dos polimorfismos de restricción descritos en Torroni y col. (1999): el *MboI* 3348 que caracteriza a todo el sub-haplogrupo, y el *MboI* 2349 que caracteriza al sub-haplogrupo U6b1. En la tabla 6 se muestra la secuencia de los cebadores utilizados, la temperatura de anillamiento y el tamaño de los productos de amplificación y restricción.

Tabla 6. Secuencia de cebadores, temperaturas de anillamiento y tamaño de los fragmentos amplificados y digeridos.

RFLP	Cebadores (5'→3')	Temp (°C)	Tamaño (pb)
MboI 2349	L2025 ¹ GCCTGGTGATAGCTGGTTGTCC	50	609
	H2591 ¹ GGAACAAGTGATTATGCTACCT		(345+264)
MboI 3348	L3073 ¹ AAAGTCCTACGTGATCTGAGTTC	52	640
	H3670 ¹ GCGTAGTTTGAGTTTGATGC		(311+285+32+12)

¹Maca-Meyer y col. (2001)

Las reacciones de amplificación se prepararon en volúmenes de 20µl y constaron de 2µl de ADN molde, tampón 1X de PCR (16'6mM (NH₄)SO₄, 67mM Tris-HCl pH 8'8), 2'5mM de MgCl₂, 5pmol de cada cebador, 0'2mM de cada desoxinucleótido trifosfato, y 0'5U de Ecotaq ADN polimerasa (Ecogen) Estas reacciones se amplificaron en un ciclador térmico PTC-100 (MJ Research) con el siguiente programa:

- ◆ 94°C durante 2 min, seguidos de 35 ciclos de
- ◆ 94°C durante 15 seg; 50-52°C durante 15 seg; 72°C durante 15 seg.
- ◆ 72°C durante 5 min.

Tras la amplificación, los productos se digirieron directamente con la endonucleasa de restricción correspondiente. Estas digestiones se realizaron en volúmenes de 10µl, mezclando 5µl de producto de amplificación con el tampón adecuado para la enzima y 1U de la endonucleasa de restricción *MboI/NdeII* (Boehringer Mannheim, 1040235). A continuación, las digestiones se incubaron en un baño a 37°C durante 2 horas. Transcurrido este periodo, se le añadió solución de carga y se corrió la totalidad del volumen en geles de poliacrilamida nativa del 6% en tampón TBE 1X, a 30V/cm durante 20 min., seguido de 15 min. de tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV.

Polimorfismo MboI 2349.

Los individuos pertenecientes al sub-grupo U6b1 presentan una transición T→C en la posición 2352, que genera una diana *MboI* (↓GATC). Así, tras la amplificación y digestión del fragmento que porta esta posición variable, los individuos pertenecientes al U6b1 presentarán dos fragmentos de 345 y 264pb, mientras que en los restantes sólo se observará una banda de 609pb, correspondiente al producto de PCR sin digerir. A continuación se muestra la secuencia del fragmento amplificado:

en negrita la zona de unión de los cebadores, en color la diana reconocida por la enzima *MboI* y en mayúscula la posición variable.

gcctggtgatagctggttgtccaagatagaatcttagttcaactttaattgcccacagaaccctctaaatccccttgtaa
 ttaactgttagtccaaagaggaacagctcttggacactaggaaaaaacctgtgagagagtaaaaaatttaacacccat
 agtaggcctaaaagcagccaccaattaagaaagcgttcaagctcaacaccactacctaaaaatcccaaacatataact
 gaactcctcacaccaattggaccaatctaccctatagaagaactaatgtagtataagtaacatgaaaacattctctc
 cgcataagcctgcgtcagatTaaaactgaactgacaattaacagcccaatatctacaatcaaccaacaagtcattattac
 cctcactgtcaaccaacacagggcatgctcataaggaaagggttaaaaaagtaaaggaactcggcaaatcttccccgc
 ctgtttacaaaaacatcacctctagcatcaccagtattagaggcaccgctgcccagtgacacatgttaacggccgcg
 tacctaaccgtgcaa**aggtagcataatcactgttcc**

Polimorfismo MboI 3348.

Todos los individuos pertenecientes al sub-haplogrupo U6 presentan una transición A→G en la posición 3348, que genera una diana *MboI* (↓GATC). El fragmento amplificado para analizar esta posición contiene, además de la diana polimórfica, dos dianas adicionales para la enzima *MboI*. Así, tras la amplificación y digestión del fragmento que porta esta posición variable, los individuos pertenecientes al sub-haplogrupo U6 presentarán cuatro fragmentos de 311, 285, 32 y 12pb, mientras que los restantes presentarán tres bandas de 596, 32 y 12pb. A continuación se muestra la secuencia del fragmento amplificado: en negrita la zona de unión de los cebadores, en color las dianas reconocidas por la enzima *MboI* y en mayúscula la posición variable.

aaagtcctacgtgactgagttcagaccggagtaatccaggtcggtttctatctacctcaaattcctccctgtacgaaag
 gacaagagaaataaggcctacttcacaaagcgcctccccgtaaatgatatcatctcaacttagtattataccacacca
 cccaagaacagggtttgtaagatggcagagcccggtaatgcataaaacttaaactttacagtcagaggtcaattcctc
 ttcttaacaacatacccatggccaacctctactctcattgtaccattct**Aatc**gcaatggcattcctaattgcttaccgaac
 gaaaaattctaggtatatacaactacgcaaaggcccaacgttgtagggccctacgggctactacaacccttcgctgacg
 ccataaaactcttcacaaagagcccctaaaaccgccacatctaccatcacctctacatcaccgccccgacctagctct
 caccatcgtcttctactatgaacccccctccccataccaaccccctggtaacctcaaccttaggcctctatttattctagc
 cacctctagcctagccgttactcaatcctct**gac**agggtgagcatcaaaactcaactacgcc

8.2.2. Amplificación y Secuenciación completa del ADNmt.

Las 16569pb que constituyen la molécula completa del ADNmt, se amplificaron en 32 fragmentos solapantes cuyos tamaños oscilaron entre 446 y 681pb. Para estas amplificaciones, se utilizaron las parejas de cebadores descritas en Maca-Meyer y col. (2001) que se detallan en la tabla 7.

Tabla 7. Parejas de cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación.

Nombre	Posición (CRS)	Secuencia 5'→3'	Fragmento (pb)	Temp. (°C)
L16340 H408	16318-16340 429-408	AGCCATTTACCGTACATAGCACA TGTTAAAAGTGCATACCGCCA	681	52
L382 H945	362-382 964-945	CAAAGAACCCTAACACCAGCC GGGAGGGGGTGATCTAAAC	603	56
L923 H1487	902-923 1508-1487	GTCACACGATTAACCCAAGTCA GTATACTTGAGGAGGGTGACGG	607	56
L1466 H2053	1445-1466 2073-2053	GAGTGCTTAGTTGAACAGGGCC TTAGAGGGTTCTGTGGGCAA	629	58
L2025 H2591	2004-2025 2612-2591	GCCTGGTGATAGCTGGTTGTCC GGAACAAGTGATTATGCTACCT	609	52
L2559 H3108	2538-2559 3128-3108	CACCGCCTGCCAGTGACACAT TCGTACAGGGAGGAATTTGAA	591	56
L3073 H3670	3051-3073 3690-3670	AAAGTCCTACGTGATCTGAGTTC GGCGTAGTTTGAGTTTGATGC	640	52
L3644 H4227	3625-3644 4247-4227	GCCACCTCTAGCCTAGCCGT ATGCTGGAGATTGTAATGGGT	623	58
L4210 H4792	4189-4210 4813-4792	CCACTCACCTAGCATTACTTA ACTCAGAAGTGAAAGGGGGCTA	625	55
L4750 H5306	4729-4750 5327-5306	CCAATACTACCAATCAATACTC GGTGATGGTGGCTATGATGGTG	599	52
L5278 H5832	5259-5278 5851-5832	TGGGCCATTATCGAAGAATT GACAGGGGTTAGGCCTCTTT	593	58
L5781 H6367	5762-5781 6387-6367	AGCCCCGGCAGGTTTGAAGC TGGCCCCTAAGATAGAGGAGA	626	58
L6337 H6899	6318-6337 6918-6899	CCTGGAGCCTCCGTAGACCT GCACTGCAGCAGATCATTTC	601	58
L6869 H7406	6850-6869 7427-7406	CCGGCGTCAAAGTATTTAGC GGGTTCTTCGAATGTGTGGTAG	578	58
L7379 H7918	7358-7379 7937-7918	AGAAGAACCCTCCATAAACCTG AGATTAGTCCGCCGTAGTCG	580	56
L7882 H8345	7861-7882 8366-8345	TCCCTCCCTTACCATCAAATCA TTTCACTGTAAAGAGGTGTTGG	506	56
L8299 H8861	8280-8299 8882-8861	ACCCCCTCTAGAGCCCACTG GAGCGAAAGCCTATAATCACTG	603	56
L8799 H9397	8779-8799 9416-9397	CTCGGACTCCTGCCTCACTCA GTGGCCTTGGTATGTGCTTT	638	58
L9362 H9928	9342-9362 9950-9928	GGCCTACTAACCAACACACTA AACCACATCTACAAAATGCCAGT	609	56

Nombre	Posición (CRS)	Secuencia 5'→3'	Fragmento (pb)	Temp. (°C)
L9886	9865-9886	TCCGCCAACTAATATTTCACTT	617	56
H10462	10481-10462	AATGAGGGGCATTTGGTAAA		
L10403	10383-10403	AAAGGATTAGACTGAACCGAA	612	56
H10975	10994-10975	CCATGATTGTGAGGGGTAGG		
L10949	10930-10949	CTCCGACCCCCTAACAACCC	617	58
H11527	11546-11527	CAAGGAAGGGGTAGGCTATG		
L11486	11467-11486	AAAAGTAGGCGGCTATGGTA	629	56
H12076	12095-12076	GGAGAATGGGGGATAGGTGT		
L12028	12008-12028	GGCTCACTCACCCACCACATT	615	58
H12603	12623-12603	ACGAACAATGCTACAGGGATG		
L12572	12553-12572	ACAACCCAGCTCTCCCTAAG	591	56
H13124	13143-13124	ATTTTCTGCTAGGGGGTGA		
L13088	13068-13088	AGCCCTACTCCACTCAAGCAC	618	58
H13666	13685-13666	AGGGTGGGGTTATTTTCGTT		
L13612	13593-13612	AAGCGCTATAGCACTCGAA	614	56
H14186	14206-14186	TGGTTGAACATTGTTTGTGG		
L14125	14104-14125	TCTTTCTTCTTCCCACTCATCC	602	58
H14685	14705-14685	CATTGGTCGTGGTTGTAGTCC		
L14650	14629-14650	CCCCATTACTAAACCCACACTC	604	58
H15211	15232-15211	TTGAACTAGGTCTGTCCCAATG		
L15162	15143-15162	CTCCCGTGAGGCCAAATATC	597	58
H15720	15739-15720	GTCTGCGGCTAGGAGTCAAT		
L15676	15657-15676	TCCCATCCTCCATATATCC	524	56
H16157	16180-16157	TGATGTGGATTGGGTTTTTATGTA		
L15996	15975-15996	CTCCACCATTAGCACCCAAAGC	446	58
H16401	16420-16401	TGATTTACGAGGATGGTG		

Las amplificaciones se realizaron en volúmenes de 50µl, a partir de 2µl de ADN molde en tampón 1X de PCR (16'6mM (NH₄)SO₄, 67mM Tris-HCl pH 8'8), 3mM de MgCl₂, 0'2mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 5pmol de cada cebador y 1U de Ecotaq ADN polimerasa (Ecogen). Las reacciones se llevaron a un ciclador térmico (MJ Research), bajo el siguiente programa de amplificación: 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 20 seg., 52-58°C (ver tabla 7) durante 20 seg., 72°C durante 20 seg y una extensión final a 72°C durante 5 min. Tras la amplificación, los productos se comprobaron mediante separación electroforética en geles de agarosa al 1'7%, tinción en bromuro de etidio durante 15 min y visualización bajo luz UV.

Precipitación con Polietilenglicol (PEG).

Debido a que el tamaño de los fragmentos amplificados en este caso era bastante grande, se optó por el uso del polietilenglicol para purificarlos antes de su secuenciación.

-Se añaden 30µl de una solución de polietilenglicol (20% PEG 8000 y 2'5M de NaCl) a 45µl de producto amplificado.

-Se homogeneiza la mezcla agitando vigorosamente y se incuba durante 30 min. en hielo prensado.

-Se centrifuga la mezcla a 13.000 rpm durante 15 min.

-Se retira la fase líquida con una pipeta Pasteur.

-Se añaden 100µl de etanol al 70% muy frío y se vuelve a centrifugar la mezcla a 13.000 rpm durante 5 min.

-Se retira el alcohol con una pipeta Pasteur y se lleva el precipitado a una estufa donde se deja secar a 37°C durante 10 min.

-Se añaden 25µl de agua estéril y se deja resuspendiendo a 4°C hasta el día siguiente. Posteriormente se conserva el producto a -80°C.

La secuenciación de los 32 fragmentos se realizó mediante el uso del fmol[®] DNA Sequencing System de Promega, empleando para ello los mismos cebadores que los utilizados en su amplificación, marcados con (γ^{32} -P) ATP. La secuenciación de estos productos es idéntica a la de los fragmentos de la RHVI, que ya ha sido detallada en la sección 4.

9. PROGRAMAS Y ESTADÍSTICOS UTILIZADOS.

9.1. Análisis de la RHVI en muestras Históricas y Prehistóricas.

Tras la lectura manual de las radiografías, se obtuvieron las posiciones mutantes de cada secuencia con respecto a la CRS. Las mutaciones se representan con el número correspondiente a la posición en la secuencia de referencia. Sólo en los casos de transversiones se añade una letra que indica el nucleótido al que ha mutado.

El análisis filogenético se inicia asignando la mayoría de los linajes encontrados a haplogrupos caracterizados por las mutaciones que presentan en el ADN

mitocondrial, siguiendo la nomenclatura de Macaulay y col. (1999) y Richards y col. (2000). En algunos casos, por falta de un fragmento determinado o por lecturas dudosas, se tuvieron que añadir posiciones variables para que la secuencia tuviera sentido filogenético.

9.1.1. Test de Diferenciación.

Este estadístico se utilizó para comprobar si existen diferencias significativas entre las poblaciones analizadas. Para ello, se empleó un método análogo al exacto de Fischer (Raymond y Rousset, 1995) disponible en el paquete estadístico ARLEQUIN 2.000 (Schneider y col., 2000; <http://anthro.unige.ch/arlequin>).

9.1.2. Diversidad.

La diversidad de las poblaciones analizadas se ha calculado simplemente como la proporción entre el número de linajes encontrados y el tamaño muestral.

9.1.3. Estimaciones de mezcla.

La estimación de la contribución relativa de las poblaciones parentales a una población híbrida, ha sido un tema muy discutido desde los años treinta (Bernstein, 1931), incluso por el término de mezcla en sí, puesto que, para algunos investigadores, se trata de un caso especial de flujo génico entre poblaciones. La mayoría de los estimadores están basados en la comparación de frecuencias alélicas o fenotípicas entre las poblaciones de origen y las híbridas. Se basan en el hecho de que las frecuencias alélicas observadas en la población mezcla, serían combinaciones lineales de las frecuencias en las poblaciones parentales, asumiendo un efecto de deriva despreciable después de la mezcla.

En este trabajo hemos realizado 4 estimaciones de mezcla diferentes, 3 de ellas están basadas en frecuencias de haplogrupos, y la cuarta tiene en cuenta la probable procedencia geográfica de los linajes compartidos por la población mezcla.

Programa ADMIX 2.0

Este programa calcula el estadístico mY , basado en una aproximación de coalescencia, que permite incorporar tanto las frecuencias génicas como la información molecular. Esta última, no ha sido tomada en cuenta debido a la edad de las poblaciones analizadas. Este estadístico fue descrito, en un primer momento, por Bertorelle y Excoffier (1998) para 2 poblaciones parentales, y ampliado para cualquier número de ellas por Dupanloup y Bertorelle (2001). Comparado con otros estimadores basados en frecuencias alélicas, mY está menos sesgado, sin embargo, su varianza es mayor si las poblaciones parentales no están bien diferenciadas. En nuestro caso, sólo hemos utilizado las frecuencias de los haplogrupos, considerando cada uno de ellos como alelos de un mismo *locus*, pero sin tener en cuenta las diferencias moleculares entre los mismos.

Programa ADMIX.PAS

Este programa utiliza el estadístico mL como estimador de mezcla y está basado tan sólo en frecuencias alélicas (Long, 1991). Además de la estima de mezcla, se obtiene un error, que se subdivide en un error de muestreo y otro debido a la varianza no explicada por el evento de mezcla y que, en ausencia de selección, da un indicio de la deriva génica, en forma de distancia genética (F_{ST}), que ha sufrido la población híbrida. Nuevamente, hemos considerado un solo *locus* con tantos alelos como haplogrupos encontrados en nuestras muestras.

Haplogrupos

Otras estimas de mezcla se han realizado teniendo en cuenta la asignación geográfica más probable de los haplogrupos presentes en la población híbrida. Así, para una estima mínima de contribución a la formación de la población canaria, hemos tomado como aportación sub-sahariana los linajes pertenecientes al superhaplogrupo L; como aportación norteafricana, los linajes del U6, y como influencia europea el resto (Haplogrupos-1). Se han eliminado de este análisis las 2 secuencias pertenecientes a los haplogrupos A y C, por su origen americano.

A continuación, se realizó el mismo cálculo que el anterior, pero incluyendo a los haplotipos considerados fundadores, de la población aborigen canaria (Rando y col., 1999), como influencia norteafricana (Haplogrupos-2). En el caso de aquellos fundadores presentes también en la Península Ibérica, se calculó la contribución relativa por área, teniendo en cuenta la frecuencia de ese determinado haplotipo en cada población parental.

Identidad

El último cálculo de mezcla se realizó en base a las identidades relativas de la población mezcla con sus parentales. Esta identidad se calcula como el cociente del número de haplotipos que comparte la población mezcla con un área geográfica específica, dividido por el número total de haplotipos que comparte con todas las poblaciones parentales. Debido a que el número de haplotipos compartidos es dependiente del tamaño muestral de las poblaciones implicadas, y nuestras poblaciones parentales presentan diferencias en sus tamaños muestrales, se corrigió este estimador multiplicando por el inverso del número de haplotipos presentes en cada población parental. Estas relaciones son extrapolables a la contribución relativa por área a la población mezcla.

9.2. Análisis de los linajes del U6.

9.2.1. Filogenia de los linajes U6.

Las relaciones filogenéticas de los distintos linajes del U6 se estimaron utilizando las redes abreviadas promedio (Bandelt y col., 1999). Estas redes fueron construidas usando el algoritmo RM con el programa NetworkWin (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) y refinadas a mano. En el caso de los linajes de la RHVI, sólo se utilizaron las posiciones entre la 16069 y la 16365, debido a que los linajes se obtuvieron de distintas fuentes de la bibliografía; además, se omitieron las posiciones 16182 y 16183. En el caso de las secuencias completas, se tuvieron en cuenta todas las posiciones variables. Para enraizar el árbol obtenido de las secuencias U6 se eligió, como linaje externo, un representante del sub-haplogrupo U5, por ser éste el más relacionado filogenéticamente.

9.2.2. Cálculo de la diversidad nucleotídica (π).

La diversidad nucleotídica, π (Nei, 1987), estima el promedio de diferencias por nucleótido, entre dos haplotipos tomados al azar. Se calcula mediante la fórmula:

$$\pi = \frac{\Sigma n^\circ \text{diferencias}}{n^\circ \text{comparaciones} \times L}$$

Donde el número de comparaciones se calcula como: $n(n-1)/2$ (dentro de un grupo) ó $n_1 \times n_2$ (entre grupos), siendo n el tamaño muestral, y L el número de nucleótidos analizados.

9.2.3. Cálculo de las edades de haplogrupos.

RHVI.

La edad del sub-haplogrupo U6 y de sus sub-grupos se calculó transformando la media de las transiciones (ρ) de todos los linajes, con respecto a un motivo central (Morral y col., 1994), en tiempo, asumiendo que una transición en esta región corresponde a 20.180 años (Forster y col., 1996). En estos cálculos las transversiones no se tuvieron en cuenta. El error se obtuvo mediante la desviación estándar (σ_{n-1}), donde n es el tamaño muestral.

Secuencias Completas.

El cálculo de las edades de los haplogrupos utilizando las secuencias completas se hizo basándose en los valores π obtenidos para el sub-haplogrupo U6 completo y para los dos sub-grupos. Se excluyó del análisis la región control, desde la posición 16024 hasta la 576, ambas inclusive. Se realizaron cuatro cálculos de π distintos:

$\bar{\pi}_T$: promedio de diferencias entre todos los linajes pertenecientes al haplogrupo o sub-haplogrupo. La edad viene dada por la fórmula: $t = \bar{\pi}_T / 2\mu$.

$\bar{\pi}_C$: promedio de diferencias entre los linajes de un grupo o sub-grupo a un motivo central. La edad viene dada por la fórmula: $t = \bar{\pi}_C / \mu$.

π_{\max} : número máximo de diferencias entre dos linajes del mismo grupo o sub-grupo, que coalescen en el motivo central. La edad se calcula por la fórmula: $t = \pi_{\max}/2\mu$.

π_{\min} : número mínimo de diferencias entre dos linajes del mismo grupo o sub-grupo, que coalescen en el motivo central. La edad se calcula por la fórmula: $t = \pi_{\min}/2\mu$.

Donde μ , la tasa de mutación para la molécula de ADN mitocondrial excluyendo la región hipervariable, es 1.7×10^{-8} sustituciones por sitio y por año (Ingman y col., 2000).

Debido a que el número de individuos analizados es pequeño, lo que hace que el error calculado sea muy grande, se ha tomado la π_{\max} y π_{\min} , como estimas de los límites superior e inferior, respectivamente, de las edades calculadas.

9.2.4. Migración de los linajes U6.

Para calcular la tasa de migración de los linajes U6 hacia la Península Ibérica desde el Norte de África y Canarias, se ha utilizado la fórmula de Bernstein (1931):

$$P_1 = P_0(1-m) + P^*m$$

Donde P es la frecuencia de los linajes U6 en la población origen, P_0 es la frecuencia inicial del U6 en la población destino, P_1 es la frecuencia actual del U6 en la población destino y m es la tasa de migración.

III. RESULTADOS

1. EFICIENCIAS DE EXTRACCIÓN.

Para realizar los cálculos de eficiencia, se han tomado como extracciones con éxito aquellas para las que, posteriormente, se pudieron amplificar al menos 3 de los 7 fragmentos de la región hipervariable I del ADNmt. En la muestra de la Concepción, se obtuvo una eficiencia del 74% (153 de 208 extracciones), aunque posteriormente se pudieron aprovechar algunas extracciones más por haber aparecido alguna mutación diagnóstica o por cortes de restricción. Con respecto a los 5 dientes de la ermita de San Blas, se obtuvieron extracciones efectivas en 4 de ellos, lo que resulta en una eficiencia del 80%. En cuanto a los dientes aborígenes, la eficiencia general fue de un 61%; por islas, la mayor se encontró en los dientes de Gran Canaria (86%) y la menor en los de El Hierro (47%). Esto parece debido al mal estado de estos últimos, ya que se ha demostrado la práctica de la cremación por parte de los Bimbaches (aborígenes herreños) con el propósito de habilitar nuevos espacios sepulcrales (<http://www.el-hierro.org/noticias2000/cultura.html>).

1.1. Eficiencia de amplificación de la RHVI del ADNmt.

No todos los fragmentos mostraron la misma eficiencia a la hora de amplificar. Esto es debido no sólo al tamaño del producto de amplificación, sino además al polimorfismo en la zona de unión de los cebadores. También nos encontramos con una mayor facilidad de contaminación de algunos fragmentos con respecto a otros. En la tabla 8, se detalla la eficiencia de amplificación por fragmento, así como el porcentaje de amplificaciones y muestras contaminadas, tanto para los dientes históricos como para los aborígenes. Se observa que, en todos los casos, la eficiencia de amplificación es superior en los dientes históricos respecto a la de los aborígenes. Sorprende el elevado número de amplificaciones contaminadas para los fragmentos L1, L4 y L6. Sin embargo, tras el clonaje y secuenciación de los productos y sus respectivos controles, en la gran mayoría de los casos, se pudo discernir entre la secuencia endógena del diente y la contaminante. Para el fragmento L4, la secuencia contaminante más abundante fue 183C 189 217 que, curiosamente, no pertenece a ningún miembro del laboratorio, siendo parte del motivo RHVI que determina al subhaplogrupo B4, característico de Asia y de los Indios Americanos. Lo mismo ocurre con el contaminante mayoritario del fragmento L6: 298 325 327, que

RESULTADOS

Tabla 8. Eficiencias de amplificación y porcentajes de contaminación para los 7 fragmentos en los que se dividió la RHVI en las muestras Histórica y de aborígenes.

FRAGMENTO		HISTÓRICA	ABORIGEN
L1	Nº Amplificaciones	49	17
	Nº Amplificaciones contaminadas	28	3
	% Amplificaciones contaminadas	57%	17'6%
	% Eficiencia	97'5% (119/122)	92'5% (37/40)
	% Muestras contaminadas	60'5%	18'9%
L2	Nº Amplificaciones	95	53
	Nº Amplificaciones contaminadas	17	6
	% Amplificaciones contaminadas	17'9%	11'3%
	% Eficiencia	83'2% (163/196)	63'4% (71/112)
	% Muestras contaminadas	17'8%	28'2%
L3	Nº Amplificaciones	108	45
	Nº Amplificaciones contaminadas	13	6
	% Amplificaciones contaminadas	12%	13'3%
	% Eficiencia	66'7% (156/234)	56'2% (59/105)
	% Muestras contaminadas	15'4%	32'2%
L4	Nº Amplificaciones	83	28
	Nº Amplificaciones contaminadas	32	9
	% Amplificaciones contaminadas	38'6%	32'1%
	% Eficiencia	83'4% (141/169)	74'7% (62/83)
	% Muestras contaminadas	49'6%	61'3%
L5	Nº Amplificaciones	105	42
	Nº Amplificaciones contaminadas	8	0
	% Amplificaciones contaminadas	7'6%	0%
	% Eficiencia	79'2% (160/202)	53'2% (50/94)
	% Muestras contaminadas	6'9%	0%
L6	Nº Amplificaciones	56	21
	Nº Amplificaciones contaminadas	35	13
	% Amplificaciones contaminadas	62'5%	61'9%
	% Eficiencia	96'2% (125/130)	94% (63/67)
	% Muestras contaminadas	68'8%	82'5%
L7	Nº Amplificaciones	78	28
	Nº Amplificaciones contaminadas	4	0
	% Amplificaciones contaminadas	5'1%	0%
	% Eficiencia	75'8% (129/170)	40'4% (23/57)
	% Muestras contaminadas	7%	0%

pertenece al haplogrupo C, también presente en Asia y en Indios Americanos. Un problema mayor apareció cuando la contaminación llevaba la mutación 311, pues ésta también forma parte del haplotipo de la autora de este trabajo. En este caso, se recurrió a los cortes con enzimas de restricción, puesto que la autora pertenece al haplogrupo HV1, que se diferencia del más común, H, porque, en el primero, la enzima *AluI* corta en la posición 7025.

1.2. Eficiencias de los polimorfismos de restricción y Amelogenina.

Las eficiencias de amplificación de los fragmentos utilizados para los polimorfismos de restricción en la muestra histórica, fueron superiores al 80%, excepto en el caso del fragmento utilizado para determinar la diana 12308 *HinfI*, que apenas superó el 50%. Esto probablemente sea debido al uso del cebador modificado. En los dientes aborígenes, estas eficiencias estuvieron entre un 45'7% y un 77'5%. Las contaminaciones ocurrieron de forma esporádica, no llegando a afectar a más del 13'3% de las muestras. En cualquier caso, la mayoría de las muestras incluidas en las amplificaciones contaminadas no se vieron influidas, ya sea por presentar patrones distintos al control negativo, o porque se repitió su amplificación. En la tabla 9, se muestran las eficiencias de amplificación y los porcentajes de contaminación por fragmento.

En lo que se refiere a la amplificación del gen de la amelogenina, para la determinación del sexo, se obtuvo una eficiencia del 70%, deducida a partir de un total de 60 individuos analizados de la muestra de la Concepción. De estos 60 individuos, 28 resultaron ser hembras y los 32 restantes machos. La contaminación, en el caso de este fragmento, apenas superó el 4% de las muestras. Estas amplificaciones no se intentaron en la muestra aborígen por falta de extracto.

Tabla 9. Eficiencias de amplificación y porcentajes de contaminación para los 4 fragmentos utilizados en los polimorfismos de restricción y el gen de la amelogenina.

FRAGMENTO	HISTÓRICA	ABORIGEN	
7025 <i>AluI</i>	Nº Amplificaciones	20	13
	Nº Amplificaciones contaminadas	3	1
	% Amplificaciones contaminadas	15%	7'7%
	% Eficiencia	80'2%	60'8%
	% Muestras contaminadas	9'6%	3'2%
12308 <i>HinfI</i>	Nº Amplificaciones	9	7
	Nº Amplificaciones contaminadas	0	0
	% Amplificaciones contaminadas	0%	0%
	% Eficiencia	59'5%	45'7%
	% Muestras contaminadas	0%	0%
3592 <i>HpaI</i>	Nº Amplificaciones	10	5
	Nº Amplificaciones contaminadas	2	1
	% Amplificaciones contaminadas	20%	20%
	% Eficiencia	84%	76%
	% Muestras contaminadas	11'5%	25%
4216 <i>NlaIII</i>	Nº Amplificaciones	10	9
	Nº Amplificaciones contaminadas	2	1
	% Amplificaciones contaminadas	20%	11'1%
	% Eficiencia	83'3%	77'5%
	% Muestras contaminadas	13'3%	16%
Amelogenina	Nº Amplificaciones	20	
	Nº Amplificaciones contaminadas	2	
	% Amplificaciones contaminadas	10%	
	% Eficiencia	70%	
	% Muestras contaminadas	4'3%	

2. POBLACIÓN HISTÓRICA.

2.1. Frecuencia de haplogrupos.

Se obtuvieron secuencias de un total de 165 extracciones correspondientes a 143 individuos de la Iglesia de la Concepción y de 4 individuos de la Ermita de San Blas (Apéndice 1). Estas dos muestras se han sumado como estimas de una población general de los siglos XVII-XVIII. De estos 147 individuos, 19 fueron desestimados por no resultar informativos debido al bajo número de fragmentos obtenidos, lo que hizo imposible su clasificación. Seis individuos más fueron eliminados para los

análisis de secuencias, pero se pudieron incluir en la muestra para los cálculos de frecuencias de haplogrupos, por haberse obtenido información de los cortes con enzimas de restricción. Así, se observaron 71 haplotipos diferentes correspondientes a 26 grupos con distintos niveles filogenéticos. En la tabla 10 se presenta la frecuencia de los haplogrupos en la muestra histórica, así como en las poblaciones actuales de Tenerife y Canarias.

Tabla 10. Frecuencias de haplogrupos encontrados en la Concepción y San Blas (sXIII) comparados con los de la población actual de Tenerife y Canarias (Rando y col., 1999).

Haplogrupo	sXVIII	Tenerife	Canarias
CRS	19 (14'85%)	14 (19'17%)	44 (14'67%)
H (-CRS)	29 (22'68%)	8 (10'96%)	21 (7'00%)
HVR	12 (9'38%)	10 (13'70%)	48 (16'00%)
V*	1 (0'78%)	3 (4'11)	7 (2'33%)
A	1 (0'78%)	-	1 (0'33%)
C	1 (0'78%)	1 (1'37%)	1 (0'33%)
J*	9 (7'03%)	1 (1'37%)	15 (5'00%)
J1	1 (0'78%)	2 (2'74%)	2 (0'67%)
J1a	-	-	3 (1'00%)
J2	-	1 (1'37%)	1 (0'33%)
T*	1 (0'78%)	-	2 (0'67%)
T1	-	3 (4'11%)	10 (3'33%)
T2	2 (1'56%)	3 (4'11%)	11 (3'67%)
T3	2 (1'56%)	3 (4'11%)	13 (4'33%)
T5	1 (0'78%)	-	1 (0'33%)
W	3 (2'34%)	-	3 (1'00%)
X	3 (2'34%)	2 (2'74%)	8 (2'67%)
I	1 (0'78%)	1 (1'37%)	3 (1'00%)
U*	2 (1'56%)	-	8 (2'67%)
U2	-	1 (1'37%)	2 (0'67%)
U3	1 (0'78%)	-	-
U4	-	1 (1'37%)	1 (0'33%)
U5*	-	-	2 (0'67%)
U5a*	1 (0'78%)	-	6 (2'00%)
U5a1	2 (1'56%)	2 (2'74%)	3 (1'00%)
U5a1a	-	1 (1'37%)	2 (0'67%)
U5b	2 (1'56%)	3 (4'11%)	7 (2'33%)
U6a	2 (1'56%)	-	3 (1'00%)
U6b	11 (8'59%)	4 (5'48%)	39 (13'00%)
K	1 (0'78%)	4 (5'48%)	12 (4'00%)
M1	-	-	1 (0'33%)
L1b	2 (1'56%)	-	6 (2'00%)
L1c	5 (3'91%)	-	-
L2	4 (3'13%)	2 (2'74%)	4 (1'33%)
L3	9 (7'03%)	3 (4'11%)	10 (3'33%)
Total	128	73	300

Teniendo en cuenta la asignación geográfica de los haplogrupos (Richards y col., 2000), cabe destacar, en la muestra Histórica, la presencia en un 1'56% de haplogrupos americanos (A y C), haplogrupos típicamente norteafricanos como el U6a (1'56%), el específico canario U6b (8'59%), haplogrupos de origen subsahariano como son los L1, L2 y L3 que totalizan un 15'63%, y los restantes, con asignación europea, que comprenden más de un 70% de la población. Observando esta tabla, sorprende la alta frecuencia, en la población Histórica, de algunos haplogrupos como pueden ser H, J* y los L1, L2 y L3 africanos y, por el contrario, la baja frecuencia, o ausencia, de otros grupos bien representados en las poblaciones actuales de Tenerife y/o Canarias, como son V*, T1, T2, T3, U5b y K. Para comprobar si estas diferencias de frecuencias eran estadísticamente significativas, se realizó un test exacto de diferenciación (Raymond y Rousset, 1995). Debido a la poca representación que tienen algunos de los grupos, se fundieron algunos, relacionados filogenéticamente, en conjuntos más amplios de la siguiente forma: H+HVR; J*+J1+J1a+J2; T*+T1+T2+T3+T5; U*+U2+U3+U4; U5*+U5a*+U5a1+U5a1a+U5b; U6a+U6b y L1b+L1c. Con estas agrupaciones, se obtuvo un valor de diferenciación de $0'112 \pm 0'024$, que indica que las diferencias que observamos entre las poblaciones no son estadísticamente significativas.

2.2. Análisis de secuencias compartidas.

El estudio de las frecuencias de los haplogrupos nos ha permitido comprobar que no existen grandes diferencias entre la población de Santa Cruz del siglo XVIII y las poblaciones actuales de Tinerfeños y Canarios. Sin embargo, la información más interesante se obtiene desglosando estos haplogrupos en los haplotipos o secuencias que los forman y viendo qué otras poblaciones comparten estas secuencias. La tabla 11 muestra las 71 secuencias encontradas en la población histórica de Tenerife, clasificadas en sus correspondientes haplogrupos, tanto por sus posiciones variables como por la información obtenida a partir de los cortes con enzimas de restricción. También se muestra la localización geográfica de las poblaciones que comparten la misma secuencia. En ciertos casos, debido a que faltaba algún fragmento por secuenciar o por lecturas dudosas, se tuvieron que añadir mutaciones que necesariamente tenían que estar presentes por la definición filogenética del grupo al que pertenecen, y que se señalan en cursiva. En otros individuos, aparecen

Tabla 11. Relación de haplotipos encontrados en las muestras de la Concepción y San Blas indicando el número de individuos, los polimorfismos de restricción analizados y las poblaciones que comparten dichos haplotipos.

Haplogrupo/ motivo	N ¹	RFLP	TF	CAN	NAf	AfN	EU	NE
H		7025AluI(-)						
CRS	19	13	✓	✓	✓		✓	✓
126	2	1	✓	✓			✓	✓
129	2	1		✓	✓		✓	✓
145	1	-			✓		✓	✓
153	1	1					✓	
168	3	3					✓	
189	2	2	✓	✓	✓		✓	✓
248	1	-	✓	✓	✓		✓	
260	1	1	✓	✓	✓			
290	1	1		✓	✓		✓	
292	1	1					✓	✓
311	2	1	✓	✓	✓		✓	✓
316	1	1					✓	✓
362	2	2		✓	✓		✓	✓
093 311	1	-			✓		✓	
273 311	1	-						
304 311	1	1			✓		✓	
311 357	1	1						
093 263 311	1	1					✓	
V*		7025 AluI (+)						
298 335	1	1					✓	
HVR		7025 AluI (+) 12308 HinfI (-) 4216 NlaIII (-)						
CRS	6	6			✓		✓	
129	1	1					✓	
311	3	3			✓		✓	
183C 189	2	1			✓		✓	
A		183C 189 223 290 319 362						
	1*	-						
C		223 298 325 327						
	1*	-	✓	✓				
J*		4216 NlaIII (+)						
069 126	5	3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
069 126 311	2	1		✓			✓	✓
069 126 318C	1	1					✓	✓
069 126 153 <u>285T</u> <u>290</u>	1	1					✓	
J1		4216 NlaIII (+)						
069 126 163 261	1	1	✓	✓				
T*		126 286 295 296 311 362						
	1							

RESULTADOS

Haplogrupo/ motivo	N	RFLP	TF	CAN	NAf	AfN	EU	NE
T2								
126 294 296 304	2		✓	✓			✓	✓
T3								
126 292 294	2	4216 <i>NlaIII</i> (+)	✓	✓	✓		✓	✓
T5								
126 153 292 294	1	4216 <i>NlaIII</i> (+)						
W								
223 292	1			✓	✓		✓	✓
223 292 295	1			✓			✓	✓
223 292 362	1						✓	
X								
093 189 223 278	1	7025 <i>AluI</i> (+) 3592 <i>HpaI</i> (-)			✓		✓	
183C 189 223 278	1	7025 <i>AluI</i> (+) 12308 <i>HinfI</i> (-) 3592 <i>HpaI</i> (-) 4216 <i>NlaIII</i> (-)			✓		✓	✓
093 189 223 274 278 356	1	12308 <i>HinfI</i> (-)						
I								
129 223 391	1						✓	✓
U3								
189 343 390	1							✓
U5a*								
192 270 294 334	1						✓	
U5a1								
114A 192 270 294	1						✓	
129 192 256 270	1							
U5b								
189 270	1		✓	✓	✓		✓	
189 270 362	1							
U6a								
172 219 278	1	12308 <i>HinfI</i> (+)					✓	✓
092 172 219 278	1	1		✓	✓		✓	
U6b								
163 172 219 311	10	12308 <i>HinfI</i> (+)	✓	✓				
092 163 172 219 311	1	1	✓	✓				
K								
093 224 311	1	-		✓	✓		✓	✓
L1b								
126 187 188A 189 223 264 270 278 311	1	3592 <i>HpaI</i> (+)					✓	
093 126 187 189 223 264 270 278 293 311	1	-		✓	✓	✓		

Haplogrupo/ motivo	N	RFLP	TF	CAN	Naf	AfN	EU	NE
L1c		3592 <i>HpaI</i> (+)						
129 187 189 223 <u>251</u> 294 311	1	-						
129 189 223 <u>231</u> 274 278 311	1	1						
129 187 189 223 278 286A 292 294 311 360	1	1						
129 187 189 265C 278 286A 292 294 311 360	1	1						
017 129 163 <i>187</i> 189 223 278 293 294 <u>301</u> 311 360	1	1				✓		
L2a		3592 <i>HpaI</i> (+)						
223 278 294 309 390	1	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
L2b		3592 <i>HpaI</i> (+)						
129 213 278 390	1	1						
213 223 278 390	1	1				✓		
L2c								
223 278 390	1	-			✓	✓		
L3								
223	2	-			✓	✓	✓	✓
223 311	2	-				✓	✓	✓
L3b		3592 <i>HpaI</i> (-)						
124 166 223 309	1	1						
124 223 278 362	1	1			✓	✓		
223 278 311 362	1	-		✓				
124 223 278 311 362	1	1				✓	✓	
L3e1a								
185 223 311 327	1	-				✓		
Total	122		15	27	29	12	44	24

TF: Tenerife actual (Rando y col., 1999); CAN: Canarias actual (Rando y col., 1999); Naf: Norte de África (Rando y col., 1998; Thomas y col., 2002; Larruga, comunicación personal); AfN: África sub-sahariana (Vigilant y col., 1990; Mateu y col., 1997; Monsalve y Hagelberg, 1997; Watson y col., 1997; Rando y col., 1998); EU: Europa (Crespillo y col., 2000; Richards y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002; Larruga, comunicación personal); NE: Oriente Próximo (Richards y col., 2000; Thomas y col., 2002). ¹Las secuencias pertenecientes a los haplogrupos A y C, marcados con asterisco (*), se han encontrado en América (Horai y col., 1993). En cursiva se señalan las mutaciones no detectadas por secuenciación pero añadidas por filogenia. Las mutaciones subrayadas indican que no se han encontrado en ese contexto.

mutaciones que no se han encontrado nunca en ese contexto, pudiendo tratarse de posibles artefactos de amplificación, y que se destacan subrayándolas, no teniéndose en cuenta a la hora de buscar homologías.

2.2.1. Secuencias únicas.

De las 71 secuencias, trece (18'3%) se consideraron únicas de la muestra Histórica, por no encontrarse en otras poblaciones. Sin embargo, algunos de estos motivos, con alguna variante, sí aparecen, como es el caso de la secuencia correspondiente al haplogrupo T5 (126 153 292 294) que se encuentra, sin la 292, en Escandinavia, Alpes y Grecia (en Richards y col., 2000). Otro caso es el del motivo 129 192 256 270 del haplogrupo U5a1 que se observa en Alemania con la 291 (en Richards y col., 2000). Incluidas en el haplogrupo L1c se han hallado cuatro secuencias únicas: 129 187 189 223 251 294 311, se ha encontrado junto con 230 y 239 en una muestra de !Kung (Vigilant y col., 1990); 129 189 223 231 274 278 311, se ha detectado en Mauritania sin 274 y con 294 y 360 (Rando y col., 1998); 129 187 189 223 278 286A 292 294 311 360 está presente en São Tomé con 265C y sin 278 (Mateu y col., 1997), con 265C y sin 286A en Portugal (González y col., 2002), y con la 265C en Azores (Santos y col., comunicación personal); 129 187 189 265C 278 286A 292 294 311 360, está presente con la 223, en Azores (Santos y col., comunicación personal). La secuencia 129 213 278 390, perteneciente al haplogrupo L2b, es interesante por carecer de la variante 223 que define a todos los L. Aunque se han encontrado retromutaciones en esta posición para otras secuencias (Mateu y col., 1997; Rando y col., 1998), este motivo concreto sólo lo hemos detectado, con la 223, en Senegal (Rando y col., 1998). Motivos muy parecidos al 124 166 223 309, incluido en el haplogrupo L3b, se han hallado en el Caribe sin la 124 (Monsalve y Hagelberg, 1997) y también en los Yoruba pero sin la 309 (en Watson y col., 1997).

2.2.2. Secuencias Americanas.

Es curiosa la presencia en la muestra Histórica de dos linajes pertenecientes a haplogrupos de asignación americana. La secuencia 183C 189 223 290 319 362 del haplogrupo A no tiene relación con la hallada en la población actual de El Hierro (Rando y col., 1999). Sin embargo, ha sido encontrada en Turquía (en Richards y

col., 2000) y también en indios colombianos (Horai y col., 1993). La otra secuencia del haplogrupo C (223 298 325 327) ha sido detectada en la población de Tenerife (Rando y col., 1999) y se encuentra extendida en indios americanos.

2.2.3. Secuencias Africanas.

Si hay algo que llama la atención en la muestra del siglo XVIII es la abundancia de linajes de origen africano que en ella se encuentran. Suman un 15'63% del total (tabla 10), más del doble de lo que se detecta en las poblaciones actuales de Tenerife y Canarias (6'85% y 6'66%, respectivamente). Con respecto al haplogrupo L1, destaca la ausencia de linajes L1c en las poblaciones canarias de hoy en día, mientras que los del L1b sí están presentes (Rando y col., 1999). De las secuencias pertenecientes al L2, sólo una de ellas (223 278 294 309 390) persiste en Tenerife, las demás tienen su localización más cercana en el Golfo de Guinea (Larruga, comunicación personal) con el motivo 213 223 278 390, y en el Norte de África con el 223 278 390 (Rando y col., 1998). La asignación de los linajes del haplogrupo L3 es más complicada, pues su asignación es ambigua. Por ejemplo, el motivo 223 311, ha sido clasificado como L3 y como I según la situación geográfica en la que se encuentre. Dos linajes, sin embargo, son inequívocamente L3: 223 278 311 362 encontrado tan sólo en Gran Canaria (Rando y col., 1999) y la secuencia 185 223 311 327 que fue muestreada únicamente en Mozambique (Pereira y col., 2001). Esta última tiene interés al relacionar directamente el tráfico de esclavos portugués con Canarias.

2.2.4. Secuencias Norteafricanas.

El sub-grupo U6a es considerado de origen norteafricano y se detecta en la población del siglo XVIII en un 1'56%. Los dos linajes que aparecen están presentes en la población actual canaria aunque sólo en un 1% (Rando y col., 1999).

2.2.5. Secuencias específicas Canarias.

Las secuencias pertenecientes al sub-grupo U6b son específicas del archipiélago, aunque se han encontrado algunos casos en la Península Ibérica (Côrte- Real y col.,

1996; Salas y col., 1998; Larruga, comunicación personal). La frecuencia que alcanza este haplogrupo en la muestra (8'59%) es intermedia entre la de la población actual de Tenerife (5'48%) y la de Canarias (13'00%). Los dos linajes que aparecen son considerados fundadores o presentes en la población aborigen que colonizó las islas siguiendo el criterio de Rando y col. (1999), quienes definieron haplotipos fundadores a aquellos que están presentes en al menos 4 de las 7 islas, o en 3 de ellas si alguna de las secuencias derivadas, estando ausente en Europa, se encuentra en otra de las islas.

2.2.6. Secuencias Europeas.

La mayoría de las secuencias halladas en la Concepción son de asignación Europea, estando ampliamente distribuidas, lo que hace difícil encontrar un nexo de unión entre un determinado lugar geográfico y la población de Tenerife del siglo XVIII.

Haplogrupo H

Este haplogrupo es el mayoritario, alcanzando un 37'53% de la muestra. Dentro de él, la secuencia de referencia o CRS, otro de los posibles haplotipos fundadores, es el más representativo (14'85%). De los 19 linajes pertenecientes a este haplogrupo, seis se encuentran en la población actual de Tenerife y tres más en Canarias (Rando y col., 1999). El resto, se distribuyen por el Norte de África, la Península Ibérica, Europa Atlántica y/o Oriente Medio, no siendo ninguno de los motivos específicos de una región concreta (Rando y col., 1998; Crespillo y col., 2000; Richards y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002).

*Haplogrupo V**

Este haplogrupo se encuentra en una frecuencia muy baja en nuestra muestra (0'78%), habiéndose detectado un solo haplotipo: 298 335. Sin embargo, este haplotipo no es muy frecuente y se ha localizado tan sólo en Madeira (Larruga, comunicación personal).

Haplogrupo HVR

Este haplogrupo alcanza una frecuencia del 9'38% y está representado por cuatro haplotipos distintos, no estando ninguno presente en las Islas actualmente. Tres de ellos, CRS, 311 y 183C 189, han sido detectados tanto en el Norte de África como en Europa, mientras que el cuarto, 129, sólo se ha observado en Europa (Richards y col., 2000; González y col., 2002; Larruga, comunicación personal).

Haplogrupos J y J1*

Estos 2 haplogrupos suman un 7'81% de la muestra Histórica. Con respecto al J*, se han encontrado 4 motivos (tabla 11), siendo uno de ellos (069 126) un posible fundador. Otro motivo, 069 126 311, está presente también en Canarias, mientras que los dos restantes están limitados a la Europa Atlántica. El haplogrupo J1 está representado por un solo haplotipo (069 126 163 261) que ha sido detectado únicamente en la población actual de Tenerife (Rando y col., 1999).

Haplogrupos T, T2, T3 y T5*

Estos 4 haplogrupos representan al 4'68% de la población. Tanto la secuencia del T* como la del T5 (tabla 11), son secuencias únicas de la población del siglo XVIII. Las dos secuencias restantes se encuentran en la población tinerfeña actual (Rando y col., 1999), siendo la secuencia del T3 (126 292 294) otro de los motivos fundadores.

Haplogrupos I, W y X

El haplogrupo I está caracterizado por una sola secuencia que no ha sido encontrada en Canarias pero sí en la Península Ibérica (González y col., 2002) y la Europa Atlántica (en Richards y col., 2000). En nuestra muestra, encontramos tres secuencias pertenecientes al haplogrupo W, dos de ellas persisten en Canarias (Rando y col., 1999) y la tercera tiene representantes en la Península y el Noroeste de Europa. Por último, con respecto al haplogrupo X, se han hallado secuencias compartidas con el Norte de África, Península Ibérica (Crespillo y col., 2000) y

Oriente Próximo (en Richards y col., 2000), excepto para el haplotipo 093 189 223 274 278 356 que es único de La Concepción.

Haplogrupos U3, U5a, U5a1 y U5b*

Del U3, sólo se ha detectado un motivo: 189 343 390, que, curiosamente, es compartido tan sólo con Jordanos (Karadsheh, comunicación personal). La secuencia 192 270 294 334 perteneciente al haplogrupo U5a* es otro de los haplotipos que solo están compartidos con una población, en este caso con los vascos (Larruga, comunicación personal). Para el haplogrupo U5a1, sólo se han encontrado dos haplotipos. Uno de ellos es único de esta población Histórica, mientras que el otro (114A 192 270 294) también se encuentra en la Península Ibérica (González y col., 2002). Por último, el haplogrupo U5b está representado por dos secuencias, una de ellas (189 270) presente en la población actual de Tenerife (Rando y col., 1999) y la segunda (189 270 362) pertenece a las secuencias únicas de la muestra Histórica.

Haplogrupo K

Este haplogrupo, aún estando bien representado en la población actual de Tenerife y Canarias (5'48% y 4'00%, respectivamente), se encuentra en muy baja frecuencia en la muestra Histórica (0'78%). El único haplotipo detectado (tabla 11) está presente en Canarias.

2.2.7. Diversidad de la población del siglo XVIII.

En nuestra muestra del siglo XVIII, nos encontramos con 71 linajes distintos correspondientes a 122 individuos. Esto supone una diversidad de un 58% para esta población, cifra que es intermedia entre la encontrada para la población actual de Tenerife (62%) y la de Canarias (46%).

2.2.8. Pervivencia y posible origen de los linajes históricos de Santa Cruz.

De los 71 linajes observados, 27 se encuentran en la población actual de Tenerife y/o Canarias, representando un 38%. Un 18'3% no se encuentra

actualmente ni en Canarias ni en el Norte de África, pero sí en poblaciones europeas, de los que el 9'9% está presente en la Península Ibérica, pudiendo ser su origen más probable, mientras que el 8'4% restante se encuentra en otras áreas del continente Europeo, con énfasis especial en la vertiente Atlántica. Con respecto a los haplotipos de asignación africana (pertenecientes al macro-haplogrupo L) sólo 3 (4'2%), se encuentran actualmente limitados a la región subsahariana del continente Africano, 2 de ellos en el oeste (Golfo de Guinea) y el otro en el este (Mozambique). El resto de los linajes negroides detectados se hallan distribuidos por diversas poblaciones tanto norteafricanas como europeas. Finalmente, podemos considerar de origen norteafricano todos los linajes del U6 (5'6%) de los que la mitad son específicos de los aborígenes canarios.

2.3. Estimaciones de mezcla para la población histórica.

El problema, a la hora de estimar las contribuciones de cada población parental a la población histórica de Tenerife, es que esas mismas poblaciones han sufrido procesos de flujo génico entre sí, por lo que no hay muchos linajes que sean específicos de un área geográfica. Así, nos encontramos con secuencias de origen africano en Europa y viceversa. Por esa razón hemos realizado distintas estimaciones de mezcla: unas teniendo en cuenta las frecuencias de los haplogrupos de la muestra Histórica en cada población parental, y otras teniendo en cuenta la asignación geográfica de los haplogrupos que comparte la población Histórica. Debido a esto, se observan diferencias en las contribuciones según el método empleado, siendo en todos los casos meras aproximaciones a un problema complejo. Los resultados de la aplicación de cada uno de los métodos, comentados en la sección 9.1.3 de Material y Métodos, se describen a continuación:

2.3.1. Estadístico mY.

Las frecuencias de haplogrupos de las 3 poblaciones parentales (Península Ibérica, Norte de África y África subsahariana), se describen en la tabla 12. Se obtuvieron unas contribuciones de 38'2%, 71'7% y -9'9% de la Península, Norte de África y Subsahara, respectivamente. El valor negativo obtenido en la aportación subsahariana indica que ésta no ha participado en la población híbrida, por lo que se

repitió el análisis teniendo en cuenta sólo 2 poblaciones parentales. En esta ocasión, se obtuvo una contribución del 56'3% proveniente de la Península y un 43'7% del Norte de África. Cabe destacar el valor altísimo de la varianza, debido a que las poblaciones parentales están poco diferenciadas.

Tabla 12. Frecuencias de haplogrupos y nº de individuos (entre paréntesis) utilizados en las estimas de mezcla mY y mL.

Haplogrupos	Poblaciones			
	TF sXVIII	Península ¹	Norte África ¹	Subsáhara ¹
HVRU*	0'500 (63)	0'601 (505)	0'382 (132)	0'013 (3)
U1+U3	0'008 (1)	0'006 (5)	0'035 (12)	0
U2+U4+U7	0	0'027 (23)	0	0
U5*+U5a*	0'008 (1)	0'038 (32)	0'018 (6)	0'008 (2)
U5a1*+U5a1a	0'016 (2)	0'017 (14)	0'009 (3)	0
U5b	0'016 (2)	0'005 (4)	0'012 (4)	0
U6	0'102 (13)	0'019 (16)	0'148 (51)	0'013 (3)
K	0'008 (1)	0'054 (45)	0'032 (11)	0
T*+T2+T3+T5	0'048 (6)	0'054 (45)	0'026 (9)	0
T1	0	0'020 (17)	0'020 (7)	0
J*+J1	0'078 (10)	0'043 (36)	0'035 (12)	0
J1a+J1b+J1b1	0	0'012 (9)	0'009 (3)	0
J2	0	0'012 (10)	0	0
I	0'008 (1)	0'008 (7)	0	0
W	0'024 (3)	0'021 (18)	0	0'013 (3)
X	0'024 (3)	0'013 (11)	0'014 (5)	0'004 (1)
L3*	0'032 (4)	0'011 (9)	0'020 (7)	0'054 (13)
L3b	0'032 (4)	0'006 (5)	0'023 (8)	0'104 (25)
L3d	0	0	0'009 (3)	0'075 (18)
L3e	0'008 (1)	0'006 (5)	0'014 (5)	0'017 (4)
M1	0	0'005 (4)	0'020 (7)	0
L1a+L1b	0'016 (2)	0'008 (7)	0'069 (24)	0'195 (47)
L1c	0'040 (5)	0'001 (1)	0'006 (2)	0'038 (9)
L2	0'032 (4)	0'013 (11)	0'099 (34)	0'466 (112)
Total	126	839	345	240

¹Flores y col. (2001a).

TF sXVIII= Población de la Concepción + San Blas.

2.3.2. Estadístico mL.

Las frecuencias de haplogrupos de las tres poblaciones parentales son las mismas que se usaron en el apartado anterior (Tabla 12). Se obtuvo un 50'9% de contribución peninsular, un 45'5% norteafricano y un 3'6% subsahariano. El error

obtenido fue del 2'5%, siendo en su mayor parte atribuible a procesos estocásticos como la deriva.

2.3.3. Haplogrupos-1.

Mediante este método, se obtienen unas contribuciones de 73'8% europeo, 10'3% norteafricano y 15'9% subsahariano. Obviamente, la aportación norteafricana está subestimada, ya que el U6 no es el único haplogrupo que ahí se encuentra y es lógico pensar que con él hayan venido otros linajes de esa zona.

2.3.4. Haplogrupos-2.

Debido al problema anteriormente expuesto de que la aportación norteafricana no se puede limitar a los linajes U6, hemos realizado otros cálculos añadiendo a dicha aportación los haplotipos fundadores, al suponerse éstos presentes en la población aborígen que colonizó las islas. El problema estriba en que dos de estos haplotipos fundadores (CRS y 069 126) están también presentes, en una frecuencia moderada, en la Península Ibérica. Por esta razón, para estimar la contribución de estos dos haplotipos, se han tomado en cuenta sus frecuencias relativas en el Norte de África (Rando y col., 1998) y en la Península Ibérica (Crespillo y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002; Larruga, comunicación personal). Así, por ejemplo, la Península Ibérica contribuye con un 60% de las secuencias CRS, mientras que el Norte de África contribuye con el 40% restante. De esta forma, seguimos teniendo una influencia del África negra del 15'9%, pero la norteafricana aumenta a un 21'1% y la peninsular disminuye a un 63%.

2.3.5. Identidad.

La última estima de mezcla la hemos realizado teniendo en cuenta las secuencias que comparte la población histórica de Tenerife con la Península Ibérica, Norte de África y África subsahariana. Así, con la península comparte 34 secuencias; con el Norte de África 29, y con el África subsahariana 12. Debido a las grandes diferencias en tamaño muestral de las poblaciones consideradas contribuyentes, se corrigió cada valor por el número de haplotipos distintos encontrados en cada población parental,

que fueron 471 para la Península Ibérica, 87 para el Norte de África y 93 para el África subsahariana. Así, proporcionalmente, se obtienen unas aportaciones del 13'5%, 62'4% y 24'1% para las poblaciones de la Península, Norte de África y subsaharianas, respectivamente.

En la tabla 13, se resumen las diferentes estimas de mezcla obtenidas con los distintos métodos empleados.

Tabla 13. Estimaciones de mezcla (%) en la población histórica.

Método	Península I.^{a,b}	Norte África^b	África Negra^b	F_{ST}^c
mY	38'2 ± 40'8	71'7 ± 51'2	-9'9 ± 11'1	
	56'3 ± 22'7	43'7 ± 22'7		
mL	50'9 ± 19	45'5 ± 23'4	3'6 ± 8'1	0'021
Haplogrupos-1	73'8	10'3	15'9	
Haplogrupos-2	63	21'1	15'9	
Identidad	13'5	62'4	24'1	

^aCrespillo y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002; Larruga, comunicación personal.
^bRando y col., 1998; Flores y col., 2001a.
^cVariación no explicada por el modelo.

3. POBLACIÓN ABORÍGEN.

3.1. Frecuencia de haplogrupos.

Se obtuvieron secuencias de un total de 77 individuos aborígenes (Apéndice 2). Catorce fueron desestimadas, diez de ellas por no resultar informativas debido al bajo número de fragmentos amplificados, dos más por ser imposible su clasificación, mientras que las dos restantes sólo se pudieron incluir para los cálculos de frecuencias de haplogrupos, por haberse obtenido información de los cortes con enzimas de restricción. De este modo, se pudieron distinguir un total de 34 haplotipos diferentes correspondientes a 13 grupos de distintos niveles filogenéticos (Tabla 14). Debido a que la muestra aborígen está compuesta por individuos pertenecientes a distintas islas, se realizó un test exacto de diferenciación (Raymond y Rousset, 1995) entre las muestras de Tenerife y La Gomera, que aportan el mayor número de representantes, para ver si están diferenciadas estadísticamente. Se obtuvo un valor de diferenciación de 0'091 ± 0'009, que indica que no existen diferencias significativas entre las dos poblaciones, por lo que se procedió a englobar a todos los

individuos como una muestra general de aborígenes canarios. En la tabla 14 se presentan las frecuencias de los haplogrupos de esta muestra de aborígenes, así como las de la población Histórica y la actual de Canarias.

Tabla 14. Frecuencias de haplogrupos encontrados en los aborígenes canarios comparados con los de la población histórica de Tenerife (este trabajo) y actual de Canarias (Rando y col., 1999). Se han incluido como CRS aquellos individuos para los que se obtuvo secuencia en 4 o más fragmentos idénticas a la CRS.

Haplogrupo	Aborígenes	Histórica	Canarias
CRS	10 (15'38%)	19 (14'85%)	44 (14'67%)
H (-CRS)	17 (26'16%)	29 (22'68%)	21 (7'00%)
HVR	4 (6'15%)	12 (9'38%)	48 (16'00%)
V*	3 (4'62%)	1 (0'78%)	7 (2'33%)
A	-	1 (0'78%)	1 (0'33%)
C	-	1 (0'78%)	1 (0'33%)
J*	3 (4'62%)	9 (7'03%)	15 (5'00%)
J1	-	1 (0'78%)	2 (0'67%)
J1a	-	-	3 (1'00%)
J2	-	-	1 (0'33%)
T*	-	1 (0'78%)	2 (0'67%)
T1	-	-	10 (3'33%)
T2	-	2 (1'56%)	11 (3'67%)
T3	5 (7'69%)	2 (1'56%)	13 (4'33%)
T5	-	1 (0'78%)	1 (0'33%)
W	-	3 (2'34%)	3 (1'00%)
X	-	3 (2'34%)	8 (2'67%)
I	-	1 (0'78%)	3 (1'00%)
U*	4 (6'15%)	2 (1'56%)	8 (2'67%)
U2	-	-	2 (0'67%)
U3	-	1 (0'78%)	-
U4	-	-	1 (0'33%)
U5*	-	-	2 (0'67%)
U5a*	-	1 (0'78%)	6 (2'00%)
U5a1	-	2 (1'56%)	3 (1'00%)
U5a1a	-	-	2 (0'67%)
U5b	-	2 (1'56%)	7 (2'33%)
U6a	1 (1'54%)	2 (1'56%)	3 (1'00%)
U6b	5 (7'69%)	11 (8'59%)	39 (13'00%)
U7	1 (1'54%)	-	-
K	5 (7'69%)	1 (0'78%)	12 (4'00%)
N1b	1 (1'54%)	-	-
M1	-	-	1 (0'33%)
L1b	-	2 (1'56%)	6 (2'00%)
L1c	-	5 (3'91%)	-
L2	-	4 (3'13%)	4 (1'33%)
L3	6 (9'23%)	9 (7'03%)	10 (3'33%)
Total	65	128	300

Teniendo en cuenta la asignación geográfica de los haplogrupos (Richards y col., 2000), cabe destacar, en la muestra aborigen, la presencia del haplogrupo U6a, típicamente norteafricano, en un 1'5%, la del U6b, específico de Canarias, en un 7'7%, y la de representantes del haplogrupo africano L3 en un 9'2%, siendo el 81'6% restante comúnmente de asignación europea.

En la misma tabla 14, son evidentes las diferencias entre la población aborigen y las demás. Por un lado, presenta frecuencias muy altas de los haplogrupos V*, K, T3 y U*, y por otro, frecuencias bajas de secuencias pertenecientes al haplogrupo J y ausencia de haplogrupos típicamente sub-saharianos como los L1 y L2. Nuevamente, se realizó un test de diferenciación (Raymond y Rousset, 1995), para ver si estas diferencias eran significativas. Para ello, se agruparon los haplogrupos de la misma manera que en el apartado 2.1, y se obtuvo un valor global de diferenciación de 0'00 \pm 0'00, indicando que las poblaciones se diferencian significativamente unas de otras.

3.2. Análisis de secuencias compartidas.

En la tabla 15 se muestran las secuencias encontradas en los aborígenes canarios, subdivididas en haplogrupos teniendo en cuenta sus posiciones variables y la información obtenida a partir de los cortes con enzimas de restricción. También se muestra la localización geográfica de las poblaciones que comparten la misma secuencia, incluyendo a la población histórica de Tenerife.

3.2.1. Secuencias únicas.

De 34 linajes aborígenes, cinco (14'7%) se consideraron únicos de la muestra por no encontrarse en ninguna de las poblaciones usadas en la comparación. De ellos uno, clasificado como J/T por medio de los cortes con enzimas de restricción, puesto que solo se pudo secuenciar un fragmento que portaba la variante 126, presente en ambos haplogrupos, se descartó para posteriores análisis. Dos no se pudieron asignar a haplogrupo alguno. Por un lado un aborigen de Tenerife, con la secuencia 051 223 294, para el que no se observó la mutación 264 para clasificarlo como L3, ni la mutación 278 para que fuese un L2. El otro es un aborigen de La Gomera con la secuencia 224 325 sin la 311 para que fuese clasificado como K. Estos dos

Tabla 15. Relación de haplotipos encontrados en la muestra de aborígenes indicando el número de individuos, los polimorfismos de restricción analizados y las poblaciones que comparten dichos haplotipos.

Haplogrupo/ motivo	N	RFLP	H	CAN	Naf	AfN	EU	NE
H			7025AluI(-)					
CRS	10	2	✓	✓	✓		✓	✓
067	1	1						✓
172	1	-		✓	✓			✓
189	3	-	✓	✓	✓		✓	✓
278	1	1		✓			✓	✓
291	1	-		✓	✓		✓	
292	2	-	✓				✓	✓
302	1	-					✓	
311	5	2	✓	✓	✓		✓	
093 192	1	-			✓			
145 213	1	-						
V			7025AluI(+)					
298	3	1		✓	✓		✓	✓
HVR			7025 AluI (+) 12308 HinfI (-) 4216 NlaIII (-)					
CRS	2	2	✓	✓	✓		✓	✓
311	1	1	✓		✓		✓	
189 316	1	1						✓
J/T			4216 NlaIII (+)					
126	1	1						
J*			4216 NlaIII (+)					
069 126	3	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
T3			4216 NlaIII (+)					
126 292 294	3	2	✓	✓	✓		✓	✓
126 292 294 399	1	1						
126 224 292 294	1	1						
U*			12308 HinfI (+)					
CRS	1	1	✓		✓		✓	✓
189	1	1					✓	
U6a1			12308 HinfI (+)					
172 189 219 278	1	1			✓			✓
U6b			12308 HinfI (+)					
163 172 219 311	5	1	✓	✓			✓	
U7			12308 HinfI (+)					
309 318T	1							✓
K								
224 311	4			✓	✓		✓	✓
189 224 311	1			✓			✓	

RESULTADOS

Haplogrupo/ motivo	N	RFLP	H	CAN	Naf	AfN	EU	NE
N1b								
<i>145 176G 223 297 311</i>	1							✓
L3								
187 223	1							
189 223	1				✓			
223 311	1		✓			✓	✓	✓
145 196 223	1							
L3d								
124 223 257	1				✓			
L3e2								
<i>081 093 175 223 278 320</i>	1					✓		
Total	64		11	13	16	3	19	17

H: Población Histórica (Este trabajo); **CAN:** Canarias actual (Rando y col., 1999); **Naf:** Norte de África (Côrte-Real y col., 1996; Rando y col., 1998; Brakez y col., 2001; Thomas y col., 2002; Larruga, comunicación personal); **AfN:** África sub-sahariana (Vigilant y col., 1990; Mateu y col., 1997; Monsalve y Hagelberg, 1997; Watson y col., 1997; Rando y col., 1998); **EU:** Europa (Crespillo y col., 2000; Richards y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002; Larruga, comunicación personal); **NE:** Oriente Próximo (Richards y col., 2000; Thomas y col., 2002). Se señalan en cursiva las mutaciones no detectadas por secuenciación pero añadidas por filogenia.

individuos no se tuvieron en cuenta en los análisis comparativos. Las secuencias únicas, engloban a un aborigen de Gran Canaria con el motivo 145 213, clasificado como H. Lo más parecido a él que se ha encontrado es el haplotipo 213 presente en bereberes de Argelia (Côte-Real y col., 1996); un aborigen de Tenerife (126 224 292 294) que sin la 224 se convierte en uno de los haplotipos fundadores (126 292 294) perteneciente al haplogrupo T3, y que se ha detectado en la población Kurda sin la 292 (en Richards y col., 2000). Las dos últimas secuencias únicas son de dos aborígenes de Gran Canaria, ambos clasificados como L3, con las variantes 187 223 y 145 196 223 que no se han encontrado en ninguna de las poblaciones utilizadas en las comparaciones.

3.2.2. Secuencias Africanas.

A diferencia de lo que ocurría con la población histórica de Tenerife, en la que se observaba un alto porcentaje de linajes negroides pertenecientes a los haplogrupos L1 y L2, éstos están ausentes en la muestra aborigen, encontrándose tan sólo representantes del haplogrupo L3. Aún así, se detectaron seis secuencias de este grupo lo que supone un 9'2% de la muestra total. De éstas, dos son secuencias únicas, una está presente en la población histórica (223 311), otras dos se encuentran en bereberes del Norte de África: 189 223 y 124 223 257 (Brakez y col., 2001; Larruga, comunicación personal), y la sexta, clasificada como L3e2, pudiera estar presente en São Tomé (Mateu y col., 1997) con el motivo 081 093 175 223 278 320, aunque de este individuo sólo se pudo amplificar un fragmento que portaba las variantes 175 223, siendo la única secuencia con un motivo exclusivamente subsahariano.

3.2.3. Secuencias Norteafricanas.

Se ha detectado un individuo perteneciente al sub-grupo U6a1, considerado de origen norteafricano. Esta secuencia (172 189 219 278) no se encuentra en la población canaria en la actualidad, sin embargo está presente en bereberes (Côte-Real y col., 1996; Thomas y col., 2002) y árabes de Marruecos (Larruga, comunicación personal).

3.2.4. Secuencias específicas Canarias.

Las secuencias pertenecientes al sub-grupo U6b, que se consideran específicas de Canarias, se han encontrado en la población aborigen en un 7'7%. Sólo se ha detectado un linaje de este haplogrupo: 163 172 219 311, que está presente, actualmente, en 6 de las 7 islas (Rando y col., 1999), y en la población Histórica de Santa Cruz, siendo considerado como uno de los motivos fundadores de la población Canaria (Rando y col., 1999).

3.2.5. Secuencias Europeas.

Más de un 80% de los linajes encontrados en la muestra aborigen se clasifican en haplogrupos que, aunque se les atribuye una asignación europea, se encuentran ampliamente distribuidos tanto por el Norte de África como por Oriente Próximo, su más probable origen. Pocos de ellos son específicos de un área o población concreta.

Haplogrupo H

Este haplogrupo es el mayoritario de la muestra, alcanzando un valor del 41'54% (Tabla 14). Sin embargo, este valor puede estar engrosado debido a que no se pudo analizar a todos los individuos para la diana de restricción 7025 *AluI*, que define a dicho haplogrupo. Dentro de él, el motivo mayoritario es el CRS (15'38%), considerado como uno de los haplotipos fundadores. De los diez linajes restantes, tres (189, 292 y 311) estaban presentes en la muestra Histórica y otros tres (172, 278 y 291) han pervivido hasta la actualidad en la población Canaria. Seis linajes se encuentran en el Norte de África: CRS, ampliamente extendido (Rando y col., 1998); 172 en Mauritania (Rando y col., 1998) y en Marruecos (Thomas y col., 2002); 189 en Marruecos y bereberes (Larruga, comunicación personal); 291 en Mauritania (Larruga, comunicación personal) y Marruecos (Thomas y col., 2002); 311 en Marruecos y bereberes (Rando y col., 1998). Al quinto, 093 192, no se le pudo amplificar el fragmento que porta la variante 192, y aunque el motivo 093 se encuentra en Alemania y Siria (Thomas y col., 2002), por proximidad geográfica le hemos supuesto la existencia de la mutación 192, equiparándolo al motivo norteafricano presente en Marruecos (Thomas y col., 2002). Las tres últimas

secuencias pertenecientes a este haplogrupo son: 067 que se observa en Oriente Próximo (Macaulay y col., 1999) la secuencia 302 que se encuentra en Alemania (Hofmann y col., 1997), y la 145 213 que es única de la muestra aborigen.

*Haplogrupo V**

Sólo se ha detectado el motivo básico de este haplogrupo que es el 298. Esta secuencia se encuentra bastante extendida detectándose tanto en la población actual Canaria (Rando y col., 1999) como en el Norte de África (Rando y col., 1998; Brakez y col., 2001; Thomas y col., 2002), Europa (Richards y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002) y Oriente Próximo (Richards y col., 2000; Thomas y col., 2002).

Haplogrupo HVR

Se han clasificado como pertenecientes a este haplogrupo aquellos individuos que mostrando corte en la diana 7025 *AluI*, lo que los descarta como posibles H, no pudieron, por secuencia, asignarse a ningún otro haplogrupo concreto. Dentro de él, se han incluido tres motivos, dos de ellos detectados previamente en la muestra Histórica (CRS y 311), y presentes también en el Norte de África y Canarias (Côte-Real y col., 1996; Rando y col., 1998; Rando y col., 1999; Brakez y col., 2001). El tercer haplotipo, 189 316, sólo se ha encontrado en Oriente Medio (Richards y col., 2000).

*Haplogrupo J**

Sólo se ha detectado un motivo perteneciente a este haplogrupo: 069 126, que está presente en todas las áreas geográficas utilizadas en las comparaciones. Éste es un haplotipo considerado fundador, se encuentra en la población Histórica de Tenerife, y en la mayoría de las islas en la actualidad (Rando y col., 1999). En el Norte de África, este motivo se ha detectado en bereberes y saharauis (Rando y col., 1998).

Haplogrupo T3

Este haplogrupo se encuentran bien representado en la muestra aborigen, alcanzando una frecuencia del 7'7%. El haplotipo 126 224 292 294 fue incluido entre los exclusivamente aborígenes. Además, nos encontramos con dos haplotipos que están muy relacionados: 126 292 294 y 126 292 294 399, y que a efectos comparativos se pueden considerar el mismo teniendo en cuenta que la posición 399 no suele ser analizada. Este motivo, presente también en la población Histórica, es otro de los haplotipos fundadores, encontrándose actualmente en tres de las islas (Rando y col., 1999). En el Norte de África ha sido detectado en bereberes (Larruga, comunicación personal).

Haplogrupos U y U7*

Dentro del haplogrupo U* se han encontrado 2 haplotipos, ambos clasificados por corte en la diana 12308 *Hinf*I. El primero, CRS, está presente en la muestra Histórica y también en el Norte de África (Larruga, comunicación personal). El problema es que en muchos trabajos no se distinguen estos CRS de los pertenecientes al haplogrupo H por no haber sido analizados con enzimas de restricción. El segundo haplotipo es el 189 que está presente en Europa (Richards y col., 2000). También se ha detectado un representante del haplogrupo U7 (309 318T), que sólo se ha encontrado en Egipto (Klings y col., 1999b).

Haplogrupo K

Este haplogrupo se halla en una frecuencia del 7'7% en la muestra de aborígenes (tabla 14), mucho mayor de la que se encontró en la población Histórica (0'78%) y en la población canaria actual (4%). Los dos motivos detectados (224 311 y 189 224 311), están presentes en la población canaria (Rando y col., 1999), y el 224 311 también lo está en varias poblaciones del Norte de África (Rando y col., 1998; Thomas y col., 2002; Larruga, comunicación personal) y en la Península Ibérica (Crespillo y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002), mientras que el motivo 189 224 311 sólo fue citado para Escocia (Helgason y col., 2000).

Haplogrupo N1b

Un individuo de La Gomera, del que sólo se obtuvo la secuencia parcial 297 311, ha sido asignado a este grupo ya que la única secuencia que se ha encontrado con estas variantes (145 176G 223 297 311) en Armenia (Richards y col., 2000) fue incluida en el haplogrupo N1b. Sin embargo, teniendo en cuenta el pequeño número de fragmentos analizados, esta clasificación no es fidedigna.

3.2.6. Diversidad de la población aborígen.

Si tenemos en cuenta los 34 linajes distintos que se han encontrado en los 64 individuos analizados, obtenemos una diversidad del 53% en la población aborígen. Este valor es menor que el obtenido en la muestra Histórica (58%), pero mayor que el de la población actual de Canarias (46%).

3.2.7. Pervivencia y posible origen de las secuencias aborígenes.

De los 29 linajes que han podido ser asignados a zonas geográficas en la muestra de aborígenes canarios, 11 (37'9%) están presentes en la población histórica de Tenerife y 13 (44'8%), han perdurado hasta hoy en día.

Con respecto al posible origen de estos linajes hemos considerado, por ser de procedencia más probable, que cuando una secuencia concreta está presente en cualquier población norteafricana, es que vino de ese lugar. También se ha diferenciado entre secuencias provenientes de la zona sahariana (Sáhara y Mauritania) y las de la zona magrebí (Marruecos y Bereberes). Teniendo en cuenta esta diferenciación, nos encontramos con 16 linajes (55'2%) que se encuentran actualmente en el Norte de África, nueve de ellos (31%) se detectan exclusivamente en la zona magrebí, mientras que los siete restantes se distribuyen tanto por el Magreb como por el Sáhara. Dos haplotipos adicionales tienen un posible origen subsahariano. Del resto de los linajes que no se han detectado en el Norte de África, cuatro (13'8%) se encuentran únicamente en Oriente Próximo y dos (6'9%), en Europa.

3.3. Estimaciones de mezcla.

Basándonos en los datos obtenidos de la población aborigen, se volvieron a realizar las estimaciones de mezcla tanto en la población histórica de Tenerife como en la canaria actual. En este caso se han utilizado como poblaciones parentales los aborígenes, la Península Ibérica y el África subsahariana. Los estimadores empleados son los mismos que en el apartado 2.3. Nuevamente, hay que recalcar las grandes diferencias observadas según el método utilizado debido, sobre todo, a las diferencias en tamaños muestrales entre las poblaciones parentales y a procesos estocásticos como la deriva. A continuación se detallan los valores obtenidos para los diferentes estimadores comentados en el apartado 9.3.1 de Material y Métodos.

3.3.1. Estadístico mY.

Para esta estimación se utilizaron las frecuencias de haplogrupos que se muestran en la tabla 16. Los valores calculados para la población Histórica utilizando este programa fueron de un 53'02% de aportación peninsular, un 39'85% aborigen y un 7'13% subsahariano. Hay que recalcar, sin embargo, que los errores obtenidos fueron un orden de magnitud superior a las estimaciones.

En el caso de la población Canaria actual, la aportación aborigen que se obtuvo fue de un 43'48%, la peninsular de un 50'67% y la subsahariana se redujo a un 5'85%. Nuevamente, los errores obtenidos fueron muy elevados.

3.3.2. Estadístico mL.

Al igual que en el caso anterior, para este estadístico, se tomaron los datos presentados en la tabla 16. Para el caso de la población Histórica, se obtuvo una contribución mayoritaria peninsular ($47'87 \pm 23'27\%$), seguida de la aborigen ($39'85 \pm 22'95\%$) y por último, de la subsahariana ($12'27 \pm 6'53\%$). Aunque los errores de estas medias siguen siendo bastante elevados, son menores que los obtenidos mediante el método mY. El error calculado por el programa es de un 2'9%, la mayor parte debido a procesos como la deriva genética.

Con respecto a la población canaria actual, la aportación aborigen no sufre demasiados cambios situándose en un $39'07 \pm 21'19\%$, sin embargo, la peninsular

aumenta hasta un $58'14 \pm 21'69\%$, y la subsahariana disminuye a un $2'79 \pm 3'74\%$.

El error calculado por el programa permanece alrededor del 2'4%.

Tabla 16. Frecuencias de haplogrupos y nº de individuos (entre paréntesis) utilizados en las estimas de mezcla mY y mL.

Haplogrupo	Poblaciones				
	Histórica	Canarias ¹	Aborígenes	Península I. ²	África N. ²
HVRU*	0'500 (63)	0'430 (128)	0'586 (38)	0'601 (505)	0'013 (3)
U1+U3	0'008 (1)	0	0	0'006 (5)	0
U2+U4+U7	0	0'010 (3)	0'015 (1)	0'027 (23)	0
U5*+U5a*	0'008 (1)	0'027 (8)	0	0'038 (32)	0'008 (2)
U5a1+U5a1a	0'016 (2)	0'017 (5)	0	0'017 (14)	0
U5b	0'016 (2)	0'023 (7)	0	0'005 (4)	0
U6	0'102 (13)	0'141 (42)	0'092 (6)	0'019 (16)	0'013 (3)
K	0'008 (1)	0'040 (12)	0'077 (5)	0'054 (45)	0
T*	0'048 (6)	0'091 (27)	0'077 (5)	0'054 (45)	0
T1	0	0'034 (10)	0	0'02 (17)	0
J*+J1	0'078 (10)	0'057 (17)	0'046 (3)	0'043 (36)	0
J1a+J1b	0	0'010 (3)	0	0'012 (9)	0
J2	0	0'003 (1)	0	0'012 (10)	0
I	0'008 (1)	0'010 (3)	0	0'008 (7)	0
W	0'024 (3)	0'010 (3)	0	0'021 (18)	0'013 (3)
X	0'024 (3)	0'027 (8)	0	0'013 (11)	0'004 (1)
L3*	0'032 (4)	0'017 (5)	0'062 (4)	0'011 (9)	0'054 (13)
L3b	0'032 (4)	0'007 (2)	0	0'006 (5)	0'104 (25)
L3d	0	0'010 (3)	0'015 (1)	0	0'075 (18)
L3e	0'008 (1)	0	0'015 (1)	0'006 (5)	0'017 (4)
M1	0	0'003 (1)	0	0'005 (4)	0
L1b	0'016 (2)	0'020 (6)	0	0'008 (7)	0'195 (47)
L1c	0'040 (5)	0	0	0'001 (1)	0'038 (9)
L2	0'032 (4)	0'013 (4)	0	0'013 (11)	0'466 (112)
N1b	0	0	0'015 (1)	0	0
Total	126	298	65	839	240

¹Rando y col. (1999).

²Flores y col. (2001a)

3.3.3. Haplogrupos-1.

Este cálculo está basado en la asignación geográfica de los haplogrupos y supone que todos los linajes pertenecientes a los haplogrupos L provienen del África subsahariana, los linajes pertenecientes al U6 son de origen aborígen y que el resto, provienen de la Península Ibérica. Este es un cálculo muy simplificado y que, obviamente, desestima la contribución aborígen al suponer que sólo contribuyen con las secuencias U6. Las estimas referentes a la población Histórica ya se calcularon en el apartado 2.3.3. Con respecto a la población actual canaria, mediante este método,

se obtienen unas aportaciones de 79'3% peninsular, 14% aborígen y 6'7% subsahariano.

3.3.4. Haplogrupos-2.

Este método tiene la misma base que el anterior pero es más refinado, ya que tiene en cuenta los haplotipos presentes en la población aborígen y los considera como aportaciones a la población híbrida. La diferencia con respecto a los cálculos realizados en el apartado 2.3.4, es que allí sólo se tuvieron en cuenta los haplotipos fundadores descritos por Rando y col. (1999), mientras que en este caso, al contar con información de la población aborígen, se han podido considerar como fundadores todos los haplotipos encontrados en ella. Al igual que en el apartado 2.3.4, para los linajes compartidos tanto por los aborígenes como por la Península Ibérica, se calculó la contribución relativa de cada población parental teniendo en cuenta la frecuencia de ese linaje en cada población. Así, por ejemplo, los aborígenes contribuyen con el 45'4% de todos los CRS encontrados en la muestra Histórica, mientras que la Península contribuye con el 54'6% restante. De esta forma se obtienen, para la muestra Histórica, unas estimas de mezcla de 54'5% peninsular, 29'6% aborígen y 15'9% subsahariano. Utilizando el mismo planteamiento para la población actual de Canarias, los porcentajes son de un 65'9% peninsular, un 27'4% aborígen y un 6'7% subsahariano.

3.3.5. Identidad.

El cálculo de la identidad se ha realizado teniendo en cuenta el número de haplotipos compartidos entre la población mezcla y cada una de las poblaciones parentales. Debido a que hay grandes diferencias entre el tamaño muestral de las poblaciones contribuyentes, se normalizaron los valores obtenidos dividiendo cada uno de ellos por el número total de haplotipos presentes en cada población. Así, por ejemplo, los 34 linajes que la Península comparte con la población Histórica se dividen por 471 que es el número de haplotipos distintos presentes en la población peninsular. Con los valores obtenidos para cada población parental, se obtienen unas contribuciones relativas del 14'3% peninsular, 60'1% aborígen y 25'6% subsahariano a la muestra Histórica.

En el caso de Canarias, las contribuciones obtenidas son de un 20'9% peninsular, un 67'9% aborigen y un 11'2% subsahariano.

En la tabla 17 se resumen los porcentajes de mezcla obtenidos con los distintos estimadores empleados.

Tabla 17. Estimaciones de mezcla en la muestra Histórica y Canarias (%).

HISTÓRICA				
Método	Aborigen	Península I.^{a,b}	África Negra^b	F_{ST}^c
mY	39'85	53'02	7'13	
mL	39'85 ± 22'95	47'87 ± 23'27	12'27 ± 6'53	2'9
Haplogrupos-1	10'3	73'8	15'9	
Haplogrupos-2	29'6	54'5	15'9	
Identidad	60'1	14'3	25'6	
CANARIAS				
mY	43'48	50'67	5'85	
mL	39'07 ± 21'19	58'14 ± 21'69	2'79 ± 3'74	2'4
Haplogrupos-1	14	79'33	6'7	
Haplogrupos-2	27'4	65'9	6'7	
Identidad	67'9	20'9	11'2	

^aCrespillo y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002; Larruga, comunicación personal.

^bRando y col., 1998; Flores y col., 2001a.

^cVariación no explicada por el modelo.

4. FILOGENIA DE LOS LINAJES DEL U6.

La filogenia del sub-haplogrupo U6 se ha construido, por un lado, a partir de secuencias publicadas de la RHVI del ADNmt, y por otro, mediante secuencias completas de diferentes linajes pertenecientes a este sub-haplogrupo.

4.1. Filogenia de los linajes U6 basada en secuencias de la RHVI.

La red obtenida a partir de los 44 linajes disponibles del sub-haplogrupo U6 se muestra en la figura 12. En un primer momento se obtuvieron siete reticulaciones que, en parte, se pudieron resolver mediante la construcción de redes adicionales en las que se le daba menos peso a algunas de las mutaciones (129, 189, 311 y 362) que se conoce son altamente recurrentes (datos no mostrados). Concretamente, en el caso del haplotipo 172 189 219 239 278 362, se le ha dado mayor peso a la mutación 239 que a la 362; en la reticulación producida por el haplotipo 172 189 219 235 278, se dio más peso a la 235 que a la 189; en las causadas por los haplotipos 092 129h 163

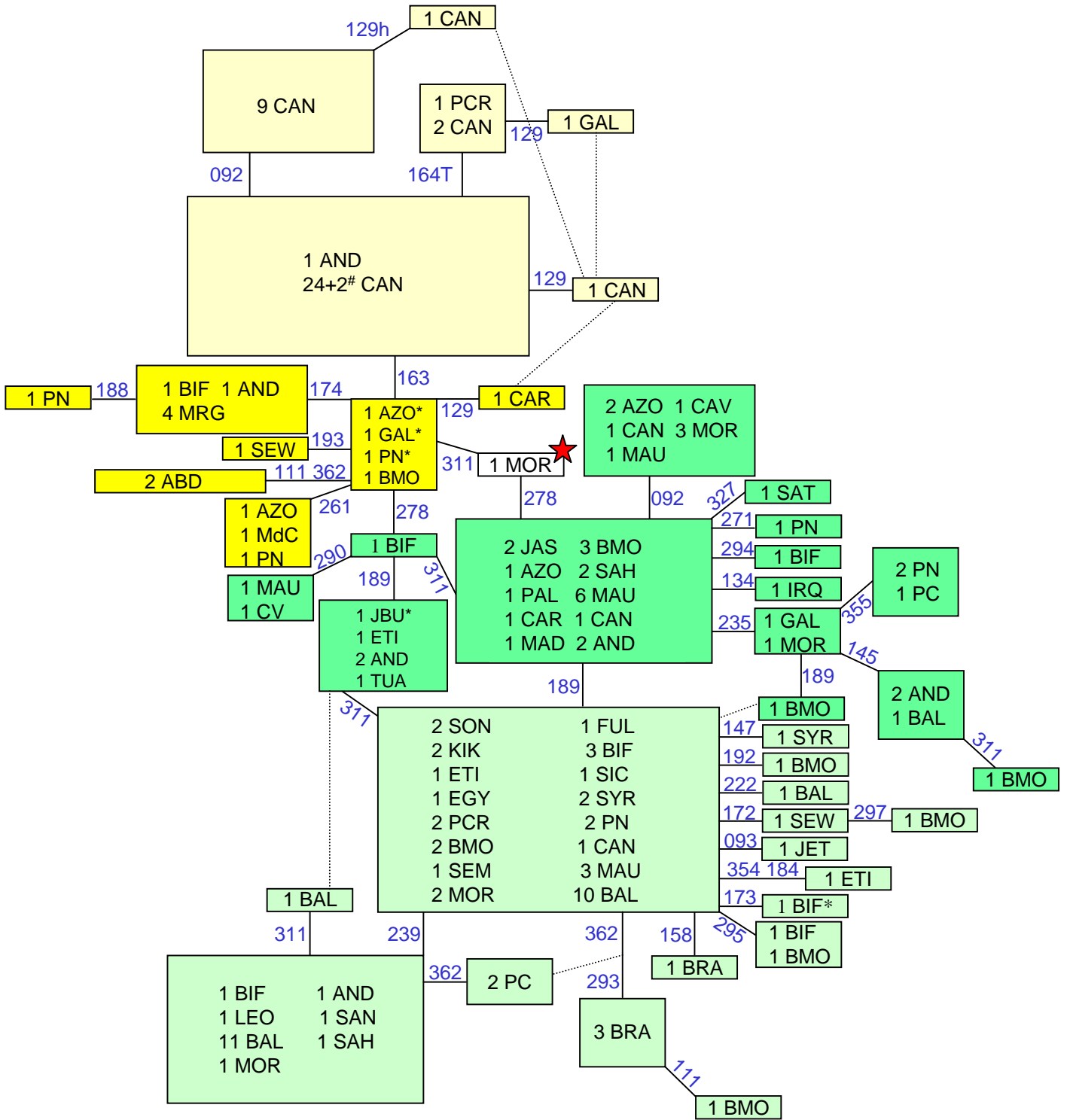


Fig. 12. Red Abreviada Promedio de los miembros del sub-haplogrupo U6. El motivo central (★) presenta las mutaciones 172 219 con respecto a la secuencia de referencia (Anderson y col., 1981). Los códigos de las poblaciones se muestran en la tabla 4. Las posiciones variables se muestran sin el prefijo 16, las transversiones se indican con el nucleótido correspondiente. Los individuos marcado con (*) presentan adicionalmente la mutación 051, y los marcados con (#) la 048. Las cajas marcadas con □, pertenecen al sub-grupo U6b1; las marcadas con ■ al sub-grupo U6b; los marcados con □ al sub-grupo U6a1, y los marcados con ■ al sub-grupo U6a.

172 219 311, 129 163 164T 172 219 311, 129 172 219 311 y 129 163 172 219 311, se les ha dado mayor peso a las mutaciones 092, 163 y 164T que a la 129 y, por último, en el caso del haplotipo 172 189 219 239 278 311 se le ha dado más peso a la mutación 239 que a la 311. Cabe destacar la localización incierta del haplotipo 111 172 219 311 362 que ha sido encontrado en dos beduinos árabes (Di Rienzo y Wilson, 1991). Por un lado, aunque comparte las mutaciones 111 y 362 con el haplotipo 111 172 189 219 278 293 362, le faltan la 189, 278 y la 293, lo que hace que se agrupe con representantes del sub-grupo U6b en vez del U6a. Aunque esto pudiera ser debido a un error en la lectura de las posiciones 189, 278 y 293 (Bandelt y col., 2001), no se puede descartar que su localización dentro de los U6b sea la correcta.

4.1.1. Edades de Coalescencia basadas en sustituciones de la RHVI.

A partir de la filogenia obtenida para las secuencias RHVI (figura 12), se pudo calcular la edad media del sub-haplogrupo U6 y de los sub-grupos que lo forman. Para ello, en cada caso, se escogieron los motivos centrales como aquellos más próximos a la raíz del grupo, y se calculó la media del número de mutaciones que separaban a los distintos haplotipos de ese motivo raíz. Las edades que se obtuvieron en los distintos casos, al transformar la divergencia en tiempo, se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Edades obtenidas para el sub-haplogrupo U6 y sus sub-grupos.

Haplogrupo / Sub-haplogrupo	Motivo Central	Edad (años) ± Error (σ_{n-1})
U6	172 219	46.015 ± 16.204
U6a	172 219 278	27.018 ± 17.584
U6a1	172 189 219 278	13.276 ± 14.572
U6b	172 219 311	24.216 ± 11.631
U6b1	163 172 219 311	6.246 ± 10.441

Aunque los errores que acompañan las estimas son bastante elevados, sobre para los sub-grupos U6a1 y U6b1, debido al pequeño tamaño muestral, se observa una mayor antigüedad del sub-haplogrupo U6a respecto al U6b, siendo el clade Canario U6b1 el sub-grupo más reciente, con una edad estimada en torno a los 6.200 años.

4.1.2. Diversidad nucleotídica.

La diversidad nucleotídica (π) obtenida para el sub-haplogrupo U6 y sus sub-grupos, se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Diversidad nucleotídica (π) obtenida en el sub-haplogrupo U6.

Sub-haplogrupo / Sub-grupo	π(%)
U6	0'98
U6a	0'60
U6a1	0'39
U6b	0'50
U6b1	0'23

4.2. Estudio de linajes completos del U6.

La red obtenida relacionando los nueve linajes completos del U6 analizados se muestra en la figura 13. Para enraizar la rama de los U6 con respecto al resto de los sub-haplogrupos del U, se utilizó como linaje externo la secuencia completa de un individuo perteneciente al sub-haplogrupo U5b (Maca-Meyer y col., 2001). A la hora de construir el árbol filogenético, se eliminó la posición 152, debido a su alta recurrencia, para evitar la formación de reticulaciones, y añadiéndose posteriormente a mano en las ramas que la presentan. A partir del árbol, se dedujo que la mutación 3348 pudiera ser común a todos los individuos pertenecientes al sub-haplogrupo U6, extremo que fue confirmado, por RFLP, en todos aquellos individuos pertenecientes al U6 disponibles en nuestro laboratorio. Asimismo, se confirmó la presencia exclusiva de la mutación 2352 en todos los linajes del sub-grupo U6b1.

4.2.1. Cálculo de edades.

El cálculo de la edad del sub-haplogrupo U6 y de sus sub-grupos se realizó por medio de la estima de las diferencias medias, mínimas y máximas entre los linajes de los distintos grupos secuenciados completamente. Los motivos centrales utilizados en cada caso se encuentran señalados en rojo en la figura 13. En la tabla 20 se relacionan las estimas de tiempos obtenidas para cada clade.

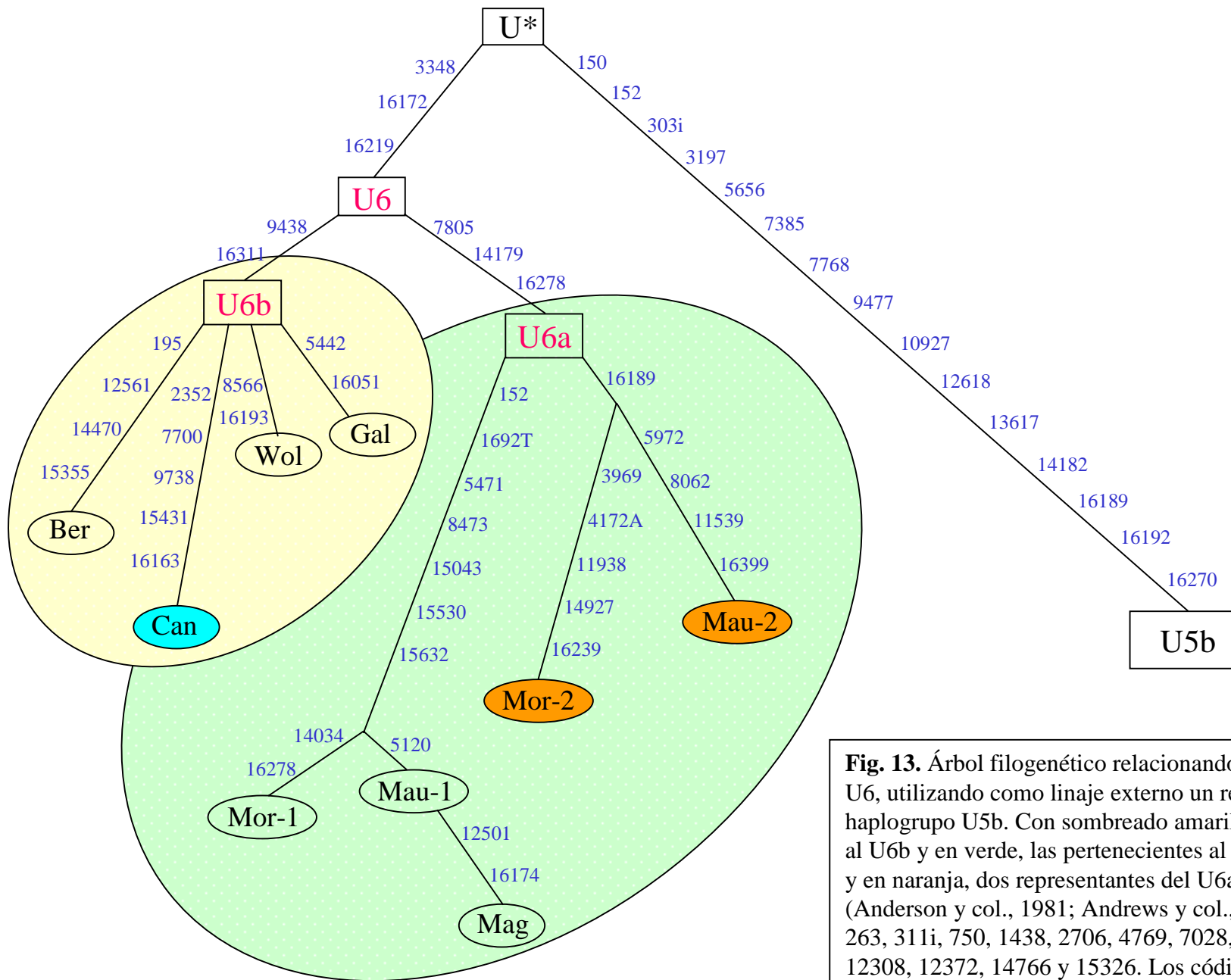


Fig. 13. Árbol filogenético relacionando los linajes completos del U6, utilizando como linaje externo un representante del sub-haplogrupo U5b. Con sombreado amarillo secuencias pertenecientes al U6b y en verde, las pertenecientes al U6a. En azul, el linaje U6b1 y en naranja, dos representantes del U6a1. El U* difiere del RCRS (Anderson y col., 1981; Andrews y col., 1999) en las posiciones: 73, 263, 311i, 750, 1438, 2706, 4769, 7028, 8860, 11467, 11719, 12308, 12372, 14766 y 15326. Los códigos de los individuos se muestran en la tabla 5.

Tabla 20. Edades (años) obtenidas para el sub-haplogrupo U6 y sus sub-grupos, U6a y U6b, según la estima de π utilizada.

	Método			
	$\bar{\pi}_T$	$\bar{\pi}_C$	π_{max}	π_{min}
U6	17.200	22.000	28.500	13.300
U6a	14.500	22.000	22.800	19.000
U6b	8.500	8.500	13.300	3.800

La diferencia observada entre los métodos $\bar{\pi}_T$ y $\bar{\pi}_C$ es debida, fundamentalmente, a que el primero tiene en cuenta la diferencia media entre todos los linajes, tanto los que han divergido desde que se expandió el haplogrupo, como los que han divergido recientemente. Calcula por tanto, una media de diferencias en la que los linajes recientes contrarrestan las diferencias entre los linajes más antiguos, disminuyendo la edad del haplogrupo. En el segundo estadístico, al determinar las diferencias de cada linaje con respecto a un motivo central, se está calculando la divergencia de todos los linajes desde que se produjo la expansión del haplogrupo. Aún así, ambos métodos confirman la mayor antigüedad del sub-grupo U6a respecto al U6b, obteniéndose para éste último una estima alrededor de 8.500 años.

IV. DISCUSIÓN

1. METODOLOGÍA.

Cuando uno comienza a trabajar con material antiguo se le presentan dos cuestiones muy importantes a resolver. Por un lado, la elección de las muestras y por otro, el diseño de un protocolo de extracción de ADN adecuado, que maximice la cantidad de ADN recuperado y minimice la probabilidad de contaminación.

1.1. Elección de las muestras.

Con respecto a las muestras, a lo largo de los años se ha demostrado que los tejidos duros (óseos y dentales) dan mejores resultados que los blandos, puesto que el ADN se encuentra menos expuesto a los factores ambientales (Cooper y col., 1992; Woodward y col., 1994a). Además, la superficie de los huesos y dientes puede ser sometida a una descontaminación con ácidos y luz UV sin que el ADN endógeno se vea afectado. Esta observación es de gran importancia, teniendo en cuenta que uno de los puntos más controvertidos del trabajo con ADN antiguo es la contaminación. Incluso dentro de los tejidos duros se ha demostrado que a partir de dientes se obtiene un ADN de mejor calidad que de los huesos (Oota y col., 1995; Meyer y col., 2000), ya que las extracciones de estos últimos suelen contener muchas sustancias inhibitorias (Zierdt y col., 1996). En nuestro caso la elección fue clara. En la Iglesia de la Concepción los dientes se encontraban en gran abundancia, lo que permitió analizar un número considerable de muestras de una misma localidad. Además, la elevada humedad existente en los enterramientos ha afectado en mayor grado a los huesos que a los dientes. Así, en estudios previos realizados sobre algunas muestras óseas, por miembros de la Universidad Autónoma de Barcelona, se detectaron diversos tipos de hongos, que imposibilitaban el análisis genético (Malgosa, comunicación personal). Aún encontrándose en mejor estado, los dientes se eligieron cuidadosamente, evitando aquellos que presentaban algún tipo de fractura o rotura. Además, siempre se intentó escoger un mismo tipo de diente por fosa para evitar la duplicidad de muestras. En algunos casos se tuvo acceso a mandíbulas, lo que posibilitó hacer extracciones independientes de un mismo individuo.

1.2. Elección del protocolo de extracción.

En los trabajos sobre ADN antiguo predominan dos tipos de protocolos de extracción: aquellos basados en el método del “fenol-cloroformo” (Hagelberg y Clegg, 1991) y los basados en el método de la “sílica” (Höss y Pääbo, 1993). A priori, ninguno de los dos métodos parece mejor que el otro. Sin embargo, Yang y col. (1998) demostraron que el uso de unas columnas comerciales de sílica (QIAquick[®], QIAGEN), tanto junto con fenol-cloroformo como por sí mismas, aumentaban el rendimiento obtenido en la extracción, al eliminar agentes inhibidores. Por esta razón, y debido a que las columnas y soluciones se podían adquirir comercialmente, lo que disminuía en parte la probabilidad de contaminación, se eligió este tipo de método. De esta forma, se diseñó un protocolo que incluía una extracción con una solución comercial de isocianato de guanidina (DNAzol[®]) y una posterior purificación utilizando las columnas de sílica. El protocolo consta de un número relativamente bajo de pasos, lo cual es importante ya que cada paso constituye una posible fuente de contaminación.

1.3. Eficiencias de extracción y amplificación.

Las eficiencias de extracción para la muestra histórica de la Iglesia de La Concepción y la Ermita de San Blas, fueron del 74% y 80%, respectivamente, mientras que la eficiencia en los aborígenes estuvo en torno a un 60%. Estos porcentajes están relacionados con la edad de las muestras, al ser los aborígenes más antiguos, se espera que la eficiencia sea menor, siempre y cuando el estado de los dientes sea equiparable en ambos casos. Estas eficiencias son difíciles de comparar con otros estudios por muchos motivos. El más importante es que cada yacimiento es distinto y las muestras pueden estar en diferentes estados de conservación, independientemente de su edad (Faerman y col., 1995). También influye el tipo de muestra que se escoja porque, como se ha mencionado antes, los rendimientos utilizando dientes suelen ser algo superiores que utilizando huesos. Otro factor a tener en cuenta es la parte de genoma que se va a analizar. Aunque los estudios poblacionales de ADN antiguo suelen centrarse en el ADNmt, en este trabajo hemos observado rendimientos algo superiores en las amplificaciones correspondientes a los polimorfismos de restricción que en las de la RHVI. Esto mismo se observa en el

trabajo de Montiel y col. (2001), aunque hay que tener en cuenta que, en este caso, el tamaño del fragmento amplificado para la RHVI es bastante mayor que para los RFLP. La razón por la que pueda haber un menor rendimiento en la RHVI pudiera ser debida al mayor polimorfismo encontrado en esa región, lo que podría dificultar el anillamiento de los cebadores durante la reacción de PCR, tal como señalan Lalueza y col. (2001). En la tabla 21 se muestran algunas de las eficiencias obtenidas por otros autores, utilizando muestras de diversas edades y distintos marcadores genéticos.

Tabla 21. Resumen de eficiencias obtenidas en diversos trabajos de ADN antiguo.

Autor	Edad (años)	Población	Región	Eficiencias
Oota y col., 1995	2.000	Japón	RHVI	34-63%
Zierdt y col., 1996	1.300-1.700	Alemania	VWA31/A	38%
Montiel y col., 2001	500	Península	RHVI	63%
Lalueza, 1997	≈2.000	Nubia	R.C.	51'7%
Lalueza, 1996a	≈700	Patagonia	R.C.	80%
Izagirre y de la Rúa, 1999	3.500-5.000	País Vasco	R.C	76'1-97%
Lalueza y col., 2001	400-1.400	Caribe	RHVI y R.C.	59-93%
Stone y Stoneking, 1998	≈700	EEUU	RHVI y R.C.	71%
Parr y col., 1996	700-1.700	EEUU	R.C.	91%
Kaestle y Smith, 2001	860-9.200	EEUU	R.C.	81%
Carlyle y col., 2000	540-1.630	EEUU	R.C.	68%
González-Oliver y col., 2001	500-1.400	México	R.C.	89%
Faerman y col., 1995	200-8.000	Israel	Amelogenina	82%
Ovchinnikov y col., 1998	300-1.000	Rusia	Amelogenina	79'2%

RHVI: Secuencia Región Hipervariable I; **R.C:** RFLP Región Codificante; **VWA31/A:** microsatélite autosómico.

1.4. Contaminaciones.

La contaminación de las muestras puede ocurrir durante cualquiera de los pasos, tanto de la extracción como de la amplificación. En este trabajo, las contaminaciones se han detectado, generalmente, en la fase de amplificación, ya que sólo en un caso se ha detectado un positivo en el control de extracción. Estas contaminaciones se han abordado de dos formas: repetición de la amplificación, desechando todas las alícuotas de los reactivos, o clonaje del producto de PCR y de sus respectivos controles de PCR. Este segundo abordaje fue necesario en tres fragmentos en los que la contaminación estuvo presente en más del 50% de las amplificaciones. Incluso cambiando los cebadores e irradiándolos rutinariamente con luz UV, fue imposible

evitar la contaminación. El clonaje de los controles, permitió discernir entre la secuencia endógena del diente y la contaminante que, en la mayoría de los casos, provenía de una sola fuente. De esta forma, y teniendo en cuenta que las secuencias obtenidas de cada individuo deben ser congruentes filogenéticamente, pocas muestras tuvieron que ser eliminadas del estudio.

Con respecto a otros trabajos, muy pocos autores citan la existencia de contaminación en sus análisis. Sólo se ha encontrado en Montiel y col. (2001) una referencia directa a sus porcentajes de contaminación. Ellos obtienen un 8% de contaminación en las extracciones, un 12'5% en las amplificaciones de la RHVI y un 6'25% en las amplificaciones de la región codificante (Montiel y col., 2001). Otros autores también citan la existencia de contaminaciones en sus trabajos, pero sin cuantificarlas (Handt y col., 1996; Stone y Stoneking, 1998; Carlyle y col., 2000; Kolman y Tuross, 2000)

1.5. Criterios de autenticidad.

La necesidad de autenticar los resultados obtenidos en los trabajos de ADN antiguo se ha hecho obvia después de que se demostrase que muchos de los grandes logros en este campo fueron artefactos (Golenberg y col., 1990; Soltis y col., 1992; Woodward y col., 1994b). Por esta razón, Cooper y Poinar (2000), publicaron nueve criterios de autenticidad que deben cumplir los trabajos sobre ADN antiguo para que sean aceptables.

Área de trabajo físicamente separada.

Este requerimiento implica que todo el trabajo sobre ADN antiguo, anterior a la amplificación, debe realizarse en un recinto físicamente separado del laboratorio general. Pensamos que en este punto se deberían incluir también las condiciones de esterilidad necesarias para realizar dichas extracciones como, por ejemplo, la limpieza rutinaria con lejía de las superficies de trabajo, el uso de material estéril, el uso de indumentaria adecuada por el investigador (guantes estériles, gorro, bata, etc.) (Handt y col., 1994a). En este estudio, todas las fases de pre-PCR se realizaron en un cuarto situado en un piso distinto al del laboratorio general, y constantemente iluminado con luz UV. Todas las condiciones de esterilidad se cumplieron,

incluyendo el uso de puntas protegidas y juegos de pipetas independientes para la extracción y preparación de las reacciones de PCR. Sin embargo, muchos trabajos no hacen hincapié en este punto (Cooper y col., 1992; Faerman y col., 1995; Anzai y col., 1999; Hummel y col., 1999; Meyer y col., 2000), que a nuestro parecer es de suma importancia.

Controles.

Este requisito recalca la necesidad de incluir en los estudios varios controles de extracción y de amplificación. Las contaminaciones con ADN contemporáneo suelen ser de dos tipos. El primero, afectaría a todas las amplificaciones y se debe a, por ejemplo, la presencia de ADN en reactivos usados en la extracción o amplificación. Este tipo de contaminación se detecta fácilmente mediante el uso rutinario de controles de extracción y de PCR. El segundo tipo, afectaría a extracciones individuales y puede provenir del manejo previo de las muestras arqueológicas o de su posterior manipulación en el laboratorio molecular. La forma de identificar este tipo de contaminación es mediante extracciones independientes de un mismo individuo (Handt y col., 1996; Marota y Rollo, 2002). En este trabajo, tras confirmar la efectividad del protocolo de descontaminación, se hizo un control de extracción con cada diente, como indicador de la existencia o no de contaminantes durante el protocolo de extracción. Para las amplificaciones, se añadieron tres controles negativos en cada reacción, ya que, muchas veces, las contaminaciones esporádicas no son detectadas con un solo control. Esto se ha confirmado puesto que, en ocasiones, sólo apareció contaminado uno de los tres controles negativos incluidos.

Comportamiento molecular apropiado.

Según este punto, el rendimiento de la amplificación por PCR debe ser inversamente proporcional al tamaño del producto (Pääbo y col., 1989; Handt y col., 1994b). Además, implica la necesidad de obtener resultados de ADNmt si se ha detectado DNA nuclear o de patógenos. Cualquier desviación de estas expectativas debe ser justificada. A este respecto, sólo se han encontrado en la bibliografía dos casos en los que se cumple este punto (Béraud-Colomb, y col., 1995; Greenwood y col., 1999). Asimismo, las secuencias obtenidas deben tener sentido filogenético.

Debido a que el ADN antiguo suele encontrarse bastante degradado, generalmente sólo es posible la amplificación de fragmentos cortos y, cuanto mayor sea el fragmento a amplificar, menor será el rendimiento de la amplificación. Esto se ha demostrado, por ejemplo, en estudios con microsatélites del cromosoma Y (Schultes y col., 1999) y en otros sobre ADNmt (Hagelberg y col., 1991; Handt y col., 1994b). En este trabajo, esta correlación inversa también se hizo evidente. Los cebadores tuvieron que diseñarse de tal forma que los fragmentos amplificados no superasen los 130pb. Aún así, para poder amplificar el fragmento correspondiente al polimorfismo de restricción 12308 *HinfI*, fue necesario diseñar otro cebador que diera un fragmento de sólo 105pb, ya que con los cebadores originales la amplificación era de 131pb y no se observaron resultados positivos. También en el caso de la amelogenina se tuvo que diseñar un nuevo cebador ante la imposibilidad de amplificar los 106/112pb que se obtienen con los cebadores originales.

Reproducibilidad.

Los resultados obtenidos a partir del mismo y distintos extractos de una muestra deben ser repetibles (Pääbo y col., 1989). También se aconseja el uso de diferentes parejas de cebadores solapantes para detectar la presencia de inserciones nucleares del ADNmt y contaminaciones. En nuestro caso, la mayoría de las muestras correspondían a dientes sueltos. Sin embargo, en ocasiones se pudo realizar extracciones independientes de un mismo individuo a partir de mandíbulas que portaban varios dientes. En todos estos casos, no se encontró ninguna incongruencia entre las secuencias obtenidas de distintos extractos.

Clonaje.

Las secuencias obtenidas deben ser verificadas mediante el clonaje de los productos de PCR para determinar la relación entre secuencias endógenas y exógenas, los errores debido al deterioro del ADN, y la posible presencia de inserciones nucleares. Sin embargo, esta técnica no se ha generalizado en todos los trabajos de secuenciación limitándose, en la mayoría de los casos, sólo a muestras de alto valor arqueológico, como son las de los neandertales (Klings y col., 1997, 1999a, 2000; Ovchinnikov y col., 2000; Schmitz y col., 2002), individuos neolíticos (Handt

y col., 1994b; di Benedetto y col., 2000), o especies extintas (Greenwood y col., 1999, 2001; Sorenson y col., 1999; Lalueza y col., 2000; Cooper y col., 2001). Con esas excepciones, pocos son los trabajos que utilizan el clonaje (Woodward y col., 1994a; Handt y col., 1996; Kolman y Tuross, 2000; Lalueza-Fox y col., 2001). En este estudio, se clonaron rutinariamente todos las amplificaciones obtenidas de los fragmentos L1F/H1R, L4F/H4R y L6F/H6R, secuenciándose como mínimo tres clones de cada individuo. Por el volumen de muestras analizadas, no fue viable el clonaje de todos los fragmentos amplificados.

Replicación independiente.

Sólo se puede eliminar la posibilidad de contaminación intra-laboratorio cuando se extraen y amplifican distintas muestras de un mismo individuo en laboratorios distintos, con resultados idénticos. Este requisito se cumple en un número incluso menor de trabajos (Handt y col., 1994b; Lalueza-Fox y col., 2000; Ovchinnikov y col., 2000; Cooper y col., 2001; Jehaes y col., 2001). Según nuestro criterio, este punto puede ser excesivo en estudios poblacionales con números elevados de muestras. Sin embargo, nos parece apropiado en los análisis de restos individuales de interés arqueológico.

Preservación bioquímica.

El grado de racemización de los aminoácidos en una muestra puede ser indicativo de la existencia o no de ADN suficiente para ser analizada con garantías. Cuando un organismo muere, los L-aminoácidos se convierten en D-enantiómeros a una velocidad que varía entre aminoácidos. El más rápido es el aspártico y su tasa de racemización es parecida a la tasa de depurinización del ADN. De esta forma se ha establecido una relación D/L de 0'1, como el límite para poder recuperar ADN, lo que equivale a unos pocos miles de años en zonas templadas como Egipto, y a unos 100.000 años en zonas frías (Poinar y col., 1996). Además, utilizando las relaciones de racemización con otros aminoácidos, se puede comprobar su congruencia o si la muestra está contaminada. Así, debido a que la tasa del aspártico es la más rápida, si se obtienen valores de racemización para la alanina o leucina superiores a la del aspártico, sería indicativo de contaminación de la muestra (Poinar y col., 1996). Este

análisis no se ha realizado en este trabajo, debido a que las muestras están muy alejadas del límite temporal para la obtención de ADN. A nuestro entender, el estudio de la racemización debería ser necesario en aquellos casos en los que la obtención de ADN fuese dudosa por tratarse de muestras muy antiguas, tal y como se ha realizado en los estudios de Krings y col. (1997), di Benedetto y col. (2000), Kolman y Tuross (2000) y Lalueza-Fox y col. (2000).

Cuantificación.

El número de copias de ADN molde presente debe ser calculado por medio de una PCR competitiva utilizando una construcción de ADN que contenga una delección o inserción con respecto al fragmento de la muestra. De esa forma, al añadir números conocidos de la construcción en la PCR competitiva, se puede calcular el número de moléculas de ADN presentes en la muestra (Handt y col., 1994b, 1996; Krings y col., 1997). Según Handt y col. (1996), en amplificaciones que comienzan con menos de 1000 moléculas, los resultados suelen variar entre experimentos debido a incorporaciones erróneas durante la PCR y a contaminaciones esporádicas. Debido a la edad de nuestras muestras analizadas, no nos ha parecido necesario cuantificar el número de moléculas por extracto.

Restos asociados.

En estudios de humanos en los que la contaminación es especialmente problemática, la evidencia de que ADN de edad similar sobrevive en fauna asociada es de gran ayuda. Además, estos restos de fauna resultan muy buenos controles negativos para las amplificaciones humanas. Este punto no se ha cumplido en este trabajo debido a que las muestras provenían de enterramientos del interior de una iglesia y en los que no se tiene constancia de restos animales.

De los nueve criterios mencionados, en este trabajo se han cumplido cinco de ellos. En este punto hay que resaltar que algunos de los criterios establecidos, aun siendo de gran importancia en estudios de restos muy antiguos, no nos parecen necesarios para aquellos, como el presente, en los que se realizan análisis poblacionales con muestras de una edad relativamente reciente. Un punto que si se

debiera añadir a los criterios, es la confirmación de que el método de descontaminación de la superficie de la muestra es realmente efectivo. En el caso de dientes, generalmente se emplea una limpieza con ácidos e irradiación con luz UV (Ginther y col., 1992). Si este método no funciona correctamente, la muestra se encontrará contaminada y esta contaminación no tiene porqué salir a la luz en los controles. Un caso todavía más problemático es el de los huesos. En los estudios generalmente se extrae el ADN a partir de la zona interna del hueso, evitando la superficie. Sin embargo, se ha demostrado que el ADN contaminante puede infiltrarse en el interior de huesos antiguos durante su manejo (Richards y col., 1995; Handt y col., 1996; Poinar y col., 1999). Si esto ha ocurrido, ni siquiera las extracciones del interior estarán libres de contaminantes y, por tanto, las extracciones independientes y repeticiones en laboratorios distintos tampoco serían decisivas (Béraud-Colomb y col., 1997). Cabe destacar también el trabajo de Kolman y Tuross (2000), donde se obtuvieron contaminaciones del 0-100% en 5 esqueletos de los EEUU. Los autores observaron que, ni los análisis de proteínas, ni la racemización de aminoácidos, ni la cuantificación de ADN, ni la imposibilidad de amplificar fragmentos grandes, fueron capaces de predecir la contaminación presente en las muestras estudiadas.

En este trabajo, hemos tenido problemas importantes de contaminación, sin embargo, su identificación nos ha permitido discernir entre la secuencia verdadera y la contaminante. Además, el hecho de que la asignación filogenética de las secuencias obtenidas se confirmen posteriormente mediante cortes con enzimas de restricción, apoya la presunción de que las secuencias sean verdaderas. Por otro lado, la diversidad encontrada tanto en la población aborigen como en la histórica, en ambos casos superior a la de la población actual canaria, es otra corroboración de autenticidad. Es muy improbable que las más de trescientas muestras analizadas en este trabajo se hayan contaminado con tantas fuentes distintas.

2. LA POBLACIÓN HISTÓRICA DE SANTA CRUZ DE TENERIFE.

La población de Santa Cruz de Tenerife, desde sus inicios, estuvo compuesta por una gran variedad de vecinos provenientes de muy diversas zonas. El hecho de ser una zona portuaria, de tránsito hacia las Indias, propiciaba el continuo flujo de gentes que se convertían en residentes o en simples transeúntes. El problema surge a la hora

de intentar cuantificar esos “extranjeros” que venían a la isla, sobre todo, porque desde el principio ni a los peninsulares ni a los portugueses se les consideraban foráneos (Cioranescu, 1998). Por tanto, para tener una ligera idea del lugar de origen de los habitantes hay que recurrir a dos fuentes: los libros de defunciones de la Iglesia de La Concepción (Sanz de Magallanes, 2001), y las partidas de casamientos donde, a partir del siglo XVIII, se obliga a mencionar la procedencia de los contrayentes (Cioranescu, 1998).

2.1. Libros de defunciones.

El libro de Sanz de Magallanes (2001) recoge todos los enterramientos en el interior de la Iglesia de La Concepción de los que ha quedado clara constancia. El archivo original se componía de 16 libros, desgraciadamente el primero se cedió para una exposición en Sevilla en 1929 y nunca fue devuelto. Este primer libro recoge los primeros 175 años de uso de la iglesia como cementerio (desde principios del siglo XVI), siendo, probablemente el más interesante para conocer el asentamiento inicial de la población. Por esa razón, los enterramientos datados de los que se disponen comienzan en 1670, con el segundo libro, y terminan en 1810. En este periodo, se registraron un total de 10.002 enterramientos. Sin embargo, el lugar de nacimiento o procedencia de los fallecidos pocas veces se especifica. La mayoría de ellos correspondían a naturales de Santa Cruz o de las islas. En cuanto a los esclavos, no se especifica en todos ellos su origen. En la tabla 22, se muestra la información recopilada de estos enterramientos (Sanz de Magallanes, 2001).

Tabla 22. Procedencia de algunos de los individuos enterrados en La Concepción y su porcentaje relativo con respecto al total de enterramientos (10.002). El resto, se supone de origen insular o peninsular.

Procedencia	Nº Enterramientos (%)
Esclavos ¹	363 (3'6%)
Color (posible procedencia de África)	218 (2'2%)
Europa	82 (0'8%)
América	10 (0'1%)

¹Sólo se especifica la condición de esclavo pero no su origen, pudiendo ser, en su mayoría, aborígenes, norteafricanos o subsaharianos.

Obviamente, estas estimas siempre son a la baja, puesto que de muchos asientos no se tiene constancia de su origen. Además, es de suponer que muchos

descendientes de extranjeros después de los años, no fuesen considerados ya como tales.

2.2. Partidas de casamientos.

Estas partidas sólo nos son de utilidad a partir del siglo XVIII, que es cuando se empieza a señalar el lugar de procedencia de los cónyuges. Nuevamente, no disponemos de información sobre los primeros años de la población de Santa Cruz. De estas partidas se extrae que el 98% de las mujeres que se casan entre 1701 y 1750 son canarias, comparado con el 81% de los hombres (Cioranescu, 1998). Esto indica el papel importante de la mujer en la formación de la sociedad insular y en el proceso de su estabilización. La mujer canaria excluye a la extranjera y acapara a los forasteros, facilitando su integración (Cioranescu, 1998). En cuanto a los españoles, casi el 40% son andaluces, seguidos por un 14% de gallegos y un 13'5% de personas provenientes de las Indias. Los franceses, italianos y portugueses, abarcan casi el 80% de los casamientos de europeos. En la tabla 23, se resume la información obtenida a partir de estas partidas de casamientos.

De las tablas 22 y 23, se puede deducir que el componente mayoritario de la población santacrucera de principios del siglo XVIII era natural de las islas o peninsular (más de un 90%). Con respecto al contingente europeo, se obtienen unas cifras que varían entre un 0'8% y un 5%, según las fuentes utilizadas. Por último, el componente africano se sitúa entre un 0'5% obtenido a través de los archivos de casamientos y un mínimo del 2'2% según los libros de defunciones. El problema surge a la hora de intentar calcular la proporción de aborígenes en la población isleña, puesto que en las fuentes ya no se hace distinción entre los aborígenes y los repobladores.

Tabla 23. Datos obtenidos de los casamientos entre 1701 y 1750 (Cioranescu, 1998).

Procedencia	Varones	Mujeres	Total
Canarias	81'35%	98'11%	89'74%
Españoles	8'55%	0'79%	4'67%
Europeos	9'28%	0'76%	5'02%
Extraleuropeos	0'79%	0'30%	0'54%
Andalucía	75 (38'5%)	9 (50%)	84 (39'4%)
Galicia	29 (14'9%)	1 (5'6%)	30 (14%)
Indias	26 (13'3%)	3 (16'7%)	29 (13'6%)
Vizcaya	18 (9'2%)	5 (27'7%)	23 (10'8%)
Baleares	13 (6'7%)	-	13 (6%)
Castilla	12 (6'1%)	-	12 (5'6%)
Cataluña	7 (3'6%)	-	7 (3'3%)
Asturias	4 (2%)	-	4 (1'9%)
Aragón	4 (2%)	-	4 (1'9%)
Navarra	3 (1'5%)	-	3 (1'4%)
León	1 (<1%)	-	1 (<1%)
Murcia	1 (<1%)	-	1 (<1%)
Valencia	1 (<1%)	-	1 (<1%)
Indeterminado	1 (<1%)	-	1 (<1%)
Francia	82 (40%)	2 (10%)	84 (37'3%)
Italia	59 (28'8%)	2 (10%)	61 (27'1%)
Portugal	30 (14'6%)	4 (20%)	34 (15'1%)
Irlanda	19 (9'3%)	8 (40%)	27 (12%)
Inglaterra	5 (2'4%)	1 (5%)	6 (2'7%)
Alemania	4 (2%)	1 (5%)	5 (2'2%)
Holanda	3 (1'5%)	2 (10%)	5 (2'2%)
Grecia	2 (<1%)	-	2 (<1%)
Luxemburgo	1 (<1%)	-	1 (<1%)

2.3. Concordancia con los datos genéticos obtenidos.

Por los datos expuestos anteriormente, se esperaba encontrar en la población histórica de Santa Cruz, un componente mayoritario europeo y otro minoritario extraeuropeo, incluyendo linajes africanos y también americanos.

Los resultados obtenidos para la población histórica de Santa Cruz revelan un componente subsahariano (15'9%) muy superior al que cabría esperar de los registros. Hay dos explicaciones posibles para esta gran diferencia: por un lado, se puede haber introducido un sesgo a la hora de escoger los dientes de estudio, pudiendo haber examinado fosas en las que abundaban los enterramientos de

africanos. Por otro lado, ya se ha mencionado que de muchos de los enterramientos no quedó clara constancia, preferentemente de los efectuados fuera del recinto de la iglesia (Sanz de Magallanes, 2001). Por esta razón, la proporción de africanos enterrados seguramente estará subestimada. Con respecto a las partidas de casamientos, puede que no todos los africanos que vivían en Santa Cruz se hayan casado por lo que esta estima de un 0'5% pudiera ser una estima mínima. Analizando las secuencias encontradas en la población histórica, nos parece más acertada la hipótesis de que los registros sean estimas mínimas por varios motivos. En primer lugar, hay que recalcar que las secuencias obtenidas corresponden a individuos que en algún momento vivieron en Santa Cruz, o incluso, al ser éste punto obligado de descanso de casi todos los traficantes que operaban en Senegal, a esclavos que ni siquiera llegaron a vivir en la isla (Cioranescu, 1998). Este hecho queda patente con los linajes pertenecientes al haplogrupo L1 encontrados en la población del siglo XVIII. El haplogrupo L1b, no se encuentra en la población tinerfeña en la actualidad, aunque sí está en las islas de Lanzarote, Gran Canaria, La Gomera y El Hierro (Rando y col., 1999). El haplogrupo L1c, está presente en casi un 4% en la población histórica, pero sólo se ha encontrado un individuo perteneciente a este grupo en Tenerife (Larruga, comunicación personal). El hecho de que secuencias que se encuentran bien representadas en la muestra histórica, no hayan sido muestreadas en la actualidad puede ser debido, por lo menos a dos razones: que se encuentren actualmente en una proporción tan baja que no se hayan detectado, o que estas secuencias, por efectos de deriva, simplemente no hayan pervivido hasta hoy en día. Lo que sí queda patente, a la hora de comparar las frecuencias de haplogrupos africanos, es la importante disminución que han sufrido todos los linajes desde el siglo XVIII hasta la actualidad, lo que confirma que llegaron a constituir un contingente bastante amplio en la población histórica de Santa Cruz, diluyéndose con el tiempo. Incluso se les llegó a considerar un peligro demográfico solicitándose, en 1683, la prohibición de entrada de negros por haber ya demasiados (Cioranescu, 1998).

Más problemática resulta la cuantificación del contingente norteafricano en la población, por el hecho de que comparten muchos linajes de asignación europea, lo que hace difícil su distinción. Si sólo consideramos como norteafricana la presencia de linajes U6a, éstos supondrían un 1'56% de la población histórica de Santa Cruz, porcentaje muy bajo teniendo en cuenta que los esclavos moriscos fueron bastante

numerosos a lo largo del siglo XVI. Sin embargo, en Santa Cruz su número no fue elevado, así: en 1594 se contabilizaban siete frente a los 196 presentes en el resto de la isla (Cioranescu, 1998).

El componente aborigen es incluso más difícil de cuantificar. Atendiendo sólo a la presencia de los linajes U6b, que, aunque encontrándose en baja frecuencia en la Península Ibérica (Salas y col., 1998; Larruga, comunicación personal), se consideran específicos de la Islas Canarias, se obtendría una estima mínima del 8'5% en la población santacruzera del siglo XVIII. El problema estriba en que resulta muy difícil calcular la proporción de aborígenes que llegaron a formar parte de la población después de la Conquista. Según el padrón realizado por orden de la Inquisición de Sevilla, a principios del siglo XVI, vivían en las Islas unas 1.200 familias indígenas, además de los elementos dispersos, sobre todo mujeres, que rápidamente se fundieron con la masa de pobladores peninsulares (Cioranescu, 1998). Se tiene constancia de la llegada a Tenerife de gomeros desterrados de su isla y de numerosos canarios que habían intervenido en la conquista y habían sido recompensados con datas y vecindad (Cioranescu, 1998). La llegada de esclavos palmeros a la isla también está documentada (Marrero, 1966). Por todo esto, es muy difícil estimar la población aborigen que formó parte del sustrato original de la población santacruzera. Además, el trasiego continuo de aborígenes de una isla a otra, ya sea como esclavos o como indígenas libres, conllevaría una posible mezcla en aquellas islas donde el comercio de esclavos fuese más importante. Si comparamos el porcentaje estimado de los linajes U6b para la muestra histórica (8'5%) con el obtenido para la población actual de Tenerife (5'5%) por Rando y col. (1999), vemos que, aunque en menor proporción que para el componente subsahariano, también se aprecia una disminución paulatina del componente aborigen en la isla.

3. LOS ABORÍGENES.

Según los datos de antropología biológica, se ha considerado a la población aborigen del archipiélago como una población heterogénea, formada por dos tipos humanos con diferentes rasgos físicos. Ambos tipos se reparten de forma distinta por las islas y tienen su correspondencia con las poblaciones pre y proto-históricas norteafricanas, de las que sus herederos serían los bereberes actuales (Arco y

Navarro, 1987). Esto se confirmó en los años sesenta cuando, tras el estudio de grupos sanguíneos de más de 300 momias de Gran Canaria y Tenerife, se encontró una frecuencia del alelo O del 94'7%, lo que las relacionaba con los bereberes (Schwarzfischer y Liebrich, 1963). Estudios moleculares posteriores sobre la población actual canaria también han mostrado una gran relación del archipiélago con el norte de África, intuyéndose este componente en la población aborigen (Rando y col., 1999; Flores y col., 2001a). En este trabajo, se ha podido establecer directamente, por primera vez, la composición genética de la población aborigen canaria.

De los resultados obtenidos de la identificación de linajes aborígenes en otras áreas geográficas, se desprende que más del 55% de los linajes encontrados en la muestra guanche tienen su localización más cercana en el norte de África, concentrándose sobre todo en la zona magrebí. Otro 7% de los linajes podrían provenir del área subsahariano occidental. Ya fuera del continente africano nos encontramos con aproximadamente un 14% de secuencias cuyo origen se establece en Oriente Próximo y otro 7% que han sido detectados en Europa. Suponemos que cuando se estudie más a fondo el continente africano, aparecerán mayores analogías con las secuencias aborígenes. Con respecto a la población actual canaria, casi un 45% de las secuencias observadas en los aborígenes han pervivido hasta hoy en día. Estas secuencias suponen actualmente el 31% de los canarios (Rando y col., 1999). Además, a partir de las secuencias aborígenes obtenidas, se han podido confirmar cuatro de los ocho haplotipos fundadores propuestos por Rando y col. (1999), al estar éstos presentes en la muestra analizada. Otro motivo (260), también considerado fundador, no fue detectado en la muestra aborigen de este estudio, sin embargo, sí se encontró en análisis preliminares de restos aborígenes (Rando, 1998).

4. ESTIMAS DE MEZCLA.

Por lo que se conoce de la historia de las Islas Canarias, queda patente la complejidad de las interacciones humanas que han dado lugar a la población actual canaria. Las islas, en un principio, estaban pobladas por aborígenes de origen norteafricano, y sobre este sustrato inicial se produjo una mezcla con contingentes europeos y africanos después de la Conquista. Todos los trabajos que se han realizado sobre la población canaria tienen la misma finalidad: establecer en qué

medida se ha producido la mezcla y, sobre todo, si han perdurado los genes aborígenes hasta hoy en día.

4.1. Estimaciones obtenidas a partir de marcadores autosómicos.

Los primeros estudios moleculares realizados sobre la población canaria estuvieron basados en las frecuencias de grupos sanguíneos (Guasch y col., 1952; Bravo y de las Casas, 1958; Parejo, 1966; Roberts y col., 1966; Rössig, 1967; Pinto y col., 1996b). Todos estos trabajos mostraban a los canarios como una población típicamente europea con cierta mezcla africana. Concretamente, Roberts y col. (1966), obtuvieron unas estimaciones de mezcla de un 72% europeo, 22% norteafricano y un 6% subsahariano (Tabla 24).

Tabla 24. Estimaciones de mezcla (%) en la población actual de Canarias.

	Europeo	Norteafricano	Subsahariano
<i>Autosomas</i>			
Roberts y col. (1996)	72	22	6
Pinto y col. (1994)	70	20	10
Moral y col. (1997) ¹	67'8	32'2	-
	94	-	6
Esteban y col. (1998)	92	8	-
	99	-	1
<i>Cromosoma Y</i>			
Flores (2001)	93'48 ± 2'88	5'93 ± 2'82	0'58 ± 0'77
Flores y col. (2001a)	91	8	1
<i>ADN mitocondrial</i>			
Pinto y col. (1996a)	35'6 ± 0'8	43'3 ± 1'4	21'2 ± 1'9
Rando y col. (1999)	62	33	5
Dupanloup y Bertorelle (2001)	17 ± 35	69 ± 34	14 ± 8

¹Estimaciones realizadas sobre la población de Tenerife.

Los polimorfismos enzimáticos también evidenciaron un componente africano en la población canaria actual. Así, en el trabajo de Pinto y col. (1994) se analizaron ocho *loci* enzimáticos y se obtuvieron unas contribuciones de 70% peninsular, 20% norteafricano y 10% subsahariano (Tabla 24). En un estudio posterior, basado en el polimorfismo de proteínas en la población actual de Tenerife (Moral y col., 1997), las contribuciones fueron muy parecidas. Cuando se utilizaron como poblaciones parentales a los europeos y norteafricanos las estimaciones fueron del 67'8% y 32'2%, respectivamente, mientras que cuando se consideraron europeos y subsaharianos,

éstas fueron de 94% y 6%, respectivamente (Tabla 24). Esteban y col. (1998), analizaron los *loci* KM y GM junto con otros polimorfismos de restricción en genes de inmunoglobulinas, y obtuvieron unas contribuciones africanas mucho menores que las anteriores. Según sus resultados y, considerando sólo a europeos y norteafricanos, las proporciones de mezcla serían 92% y 8%, respectivamente, mientras que cuando se tenían en cuenta a europeos y subsaharianos, éstos últimos contribuían tan sólo con un 1% (Tabla 24).

4.2. Estimaciones obtenidas a partir del cromosoma Y.

Por poseer características similares, no sufrir procesos de recombinación y de herencia uniparental, el cromosoma Y se considera análogo al ADNmt. Su estudio en las poblaciones canarias ha ofrecido una visión complementaria a la que se tenía anteriormente. En las islas se encuentran linajes con un origen claramente subsahariano (DE*(xE3) y E3a), alcanzando una frecuencia máxima en El Hierro (Flores, 2001). También están presentes tres linajes (E3b1, E3b2 y J2f) que, por presentar frecuencias superiores en las islas que en la península, podrían reflejar influencias directas con el norte de África (Flores, 2001). Sin embargo, el conjunto de la población canaria es mayoritariamente europeo (>90%), encontrándose <10% de linajes africanos (Flores, 2001; Flores y col., 2001a; Flores y col., 2003). Estos resultados reflejan una entrada importante de componente europeo masculino en las islas, desplazando al autóctono, tras la Conquista.

4.3. Estimaciones obtenidas a partir del ADNmt.

Las primeras estimaciones de mezcla obtenidas a partir de datos de ADNmt (Pinto y col., 1996a), reflejaron en la población canaria un componente mayoritario bereber (43'3%) y una influencia subsahariana mucho mayor que la obtenida a partir de otros sistemas (21'2%). Aunque estos datos concuerdan con la asimetría sexual encontrada en las islas, el número de individuos analizados era muy pequeño. En un estudio posterior, en el que los tamaños muestrales fueron ampliados, se obtuvieron unas estimaciones muy diferentes (Rando y col., 1999). La contribución peninsular aumentaba a un 62%, seguida de la norteafricana con un 33% y la subsahariana descendía a un 5%. Aunque las diferencias entre ambos trabajos podrían ser debidas a los distintos

tamaños muestrales usados, otro factor muy importante es el estadístico utilizado para calcular estas estimas. Esta importancia se ve reflejada en los valores obtenidos por Dupanloup y Bertorelle (2001), utilizando los datos publicados en Pinto y col. (1996a). Empleando el estadístico mY, estos autores obtienen una contribución peninsular de tan sólo el 17%, una bereber del 69% y una subsahariana del 14%. La diferencia entre los valores obtenidos en los dos trabajos es clara, y lo único que ha variado es el método de estimación.

Los datos obtenidos en este trabajo, sobre los linajes presentes en los aborígenes canarios, han permitido realizar unas estimas de mezcla utilizando, por primera vez, a los aborígenes como una de las poblaciones parentales. De esta manera, se obtuvo una contribución aborígen del 14-67'9%, según el estadístico utilizado. La contribución del 14%, es una estima muy a la baja, puesto que sólo se consideró como aportación aborígen los linajes pertenecientes al sub-haplogrupo U6. Por los datos obtenidos de la población aborígen de este trabajo, se observa que hay muchos más linajes de asignación europea presentes en la muestra autóctona, por lo que se demuestra que, aun siendo el U6 una aportación aborígen importante a la población actual canaria, no es la única. Una estima, derivada de esta anterior, que tenga en cuenta todos los linajes presentes en la población aborígen y su representación relativa en europeos, eleva su contribución a un 27'4%. Sin embargo, suponemos que al aumentar el número de muestras de aborígenes y extenderlas a más islas, se obtenga, probablemente, un valor más alto. Las estimas obtenidas por medio de los estadísticos mL (Long, 1991) y mY (Bertorelle y Excoffier, 1998), dan valores parecidos en torno a un 40%. No obstante, los errores que se obtienen tras aplicar estos estadísticos son muy elevados, sobre todo para el método mY, principalmente debido a que las poblaciones parentales no se encuentran muy diferenciadas. Aún así, las medias de estas estimas concuerdan, bastante bien, con las obtenidas anteriormente con ADNmt actual. El valor más alto obtenido de contribución aborígen a la población actual canaria (67'9%), resulta al tener en cuenta los linajes compartidos entre cada población parental y la híbrida. Al estar estos valores corregidos por el número de haplotipos detectados en las poblaciones parentales, y debido a las diferencias en el tamaño de las muestras, la aportación de la población aborígen puede estar sobrevalorada.

4.4. Concordancia entre las estimas de mezcla y la historia de las Islas Canarias.

Las estimas de mezcla obtenidas para los distintos sistemas, resaltan la importante asimetría sexual existente en las contribuciones de las poblaciones parentales a la población canaria. Esta asimetría ya ha sido puesta en evidencia en muchos trabajos sobre las islas (Pinto y col., 1996a; Rando y col., 1999; Flores, 2001; Flores y col., 2001a,b). Tomando las medias de las aportaciones obtenidas para los distintos sistemas, se obtienen unas contribuciones relativas que se presentan en la figura 14.

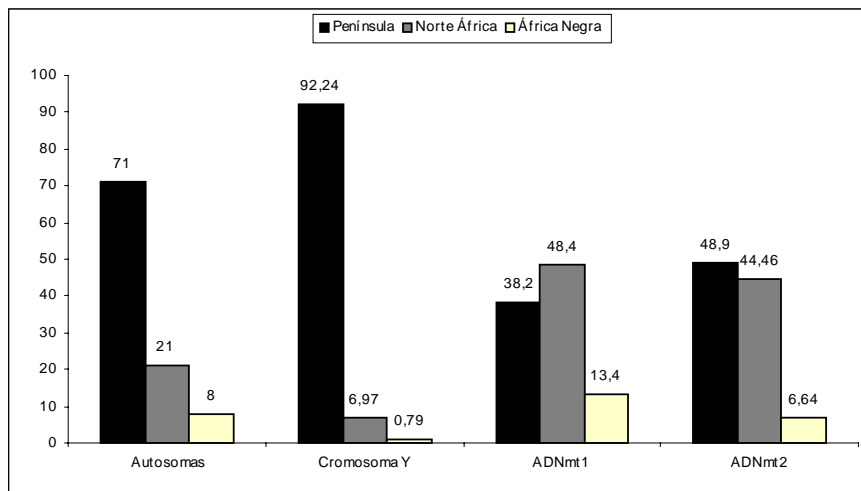


Fig. 14. Gráfico mostrando la media de las contribuciones por área para los distintos marcadores. En el caso de ADNmt2, la población parental corresponde a los aborígenes.

El gráfico muestra claramente la diferencia existente entre los resultados obtenidos a través de los sistemas de herencia uniparental, y cómo los valores de los autosomas son intermedios entre los anteriores. Esta asimetría sexual, con una mayoría de linajes paternos europeos y un valor muy alto de linajes maternos africanos, concuerda con los datos históricos de la Conquista y poblamiento de las Islas. Aunque, por desgracia, no se tienen datos exactos sobre la situación general de los aborígenes después de la Conquista, sí se conoce que hubo muchas bajas durante y después de ella, ya sea debido a las luchas en sí, o por las enfermedades traídas por los nuevos pobladores para las que los aborígenes no estaban inmunizados (Hernández, 1999). Muchos de los que sobrevivieron a la Conquista fueron esclavizados, trasladados de una isla a otra y al continente o fusionados con la población colonizadora (Suárez y col., 1988). Aunque es de suponer que las enfermedades hayan diezmando a la población en general, independientemente de sexo y edad, la muerte violenta por la guerra afectó en su mayoría a los hombres. El

posterior poblamiento de las islas, se realizó en su mayoría por castellanos, andaluces, gallegos y portugueses y, en el caso de las islas de señorío, por normandos (Suárez y col., 1988; Hernández y col., 1999). Esta entrada importante de un contingente europeo, mayoritariamente masculino ya que muy pocos colonizadores vinieron con mujeres, explicaría la gran proporción de linajes europeos que se observan en los estudios del cromosoma Y. Por el contrario, al ser el número de mujeres europeas que llegan a las islas muy bajo (Suárez y col., 1988), son las isleñas las que acaparan a los forasteros y los integran en la sociedad insular. Esta notable asimetría en la procedencia de las mujeres en las islas se observa claramente en las partidas de casamientos, incluso dos siglos después de la Conquista (Cioranescu, 1998), y explicaría el alto porcentaje de linajes aborígenes encontrados en la población actual para el ADNmt.

5. SUB-HAPLOGRUPO U6.

El sub-haplogrupo U6 es considerado un marcador específicamente norteafricano, y su presencia en el archipiélago canario demuestra el nexo de unión existente entre los antiguos pobladores isleños y el continente africano. Actualmente, estas secuencias se extienden desde Oriente Próximo hasta Canarias a lo largo de la costa norteafricana, y desde el Sahel hasta el Mediterráneo. Fuera de este área sólo se han encontrado esporádicamente en la Península Ibérica (Salas y col., 1998; Crespillo y col., 2000; Pereira y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002; Larruga, comunicación personal), Sicilia (Cali y col., 2001) y en comunidades judías del Norte de Europa (Thomas y col., 2002). Cabe destacar, también, la presencia de estas secuencias en el continente americano, siendo una clara influencia de la colonización española y portuguesa (Alves-Silva y col., 2000). Curiosamente, en Cuba han sido detectados representantes del sub-grupo U6b1, típico de los aborígenes canarios, testimoniando así la incidencia que los canarios tuvieron en el poblamiento de esa isla (Torroni y col., 1999).

5.1. Filogenia obtenida a partir de la RHVI.

La filogenia obtenida a partir de la RHVI de individuos pertenecientes al sub-haplogrupo U6 (figura 12), muestra la existencia de dos ramas que divergen desde el

motivo central 172 219: una, definida por la mutación 278, que daría lugar al sub-grupo U6a, y otra, definida por la 311, que caracteriza al sub-grupo U6b. El U6a se halla mucho más extendido geográficamente que el U6b, más restringido al área occidental incluyendo canarios, bereberes, beduinos, peninsulares y wolof (Di Rienzo y Wilson, 1991; Côrte-Real y col., 1996; Rando y col., 1998, 1999). Sin embargo, representantes del U6a, se detectan desde Oriente Medio hasta el borde Noroccidental de África, llegando, por el sur, hasta São Tomé (Mateu y col., 1997) y, esporádicamente, a Europa donde su presencia se limita a la Península Ibérica (Côrte-Real y col., 1996; Pereira y col., 2000; Larruga y col., 2001; González y col., 2002) y a los judíos Ashkenazic de Alemania (Thomas y col., 2002). Analizando la procedencia geográfica de los individuos incluidos en cada clado, se observa que, cuando están compartidos por varias poblaciones, éstas se encuentran geográfica y/o históricamente relacionadas. Así, por ejemplo, exceptuando los haplotipos únicos y/o los U6b1, aquellos que se detectan en la Península Ibérica se encuentran también en poblaciones norteafricanas, pudiendo deberse a un flujo génico entre ambas regiones durante la ocupación morisca (Pereira y col., 2000) o en épocas prehistóricas (González y col., 2002).

Edad del sub-haplogrupo U6.

En la tabla 25 se muestran las edades obtenidas para el sub-haplogrupo U6 y sus sub-grupos calculadas a partir de la información obtenida de la RHVI. En todos los casos, la edad del U6 ha sido estimada tomando como motivo central el haplotipo 172 219. Macaulay y col. (1999), propusieron una edad para el U6 de 51.000 ± 9.500 , similar a la que obtuvieron para el sub-haplogrupo U5, de asignación paleolítica en Europa y, filogenéticamente, relacionado con el U6 (Maca-Meyer y col., 2001). Una edad parecida (47.000 años) fue obtenida por Rando y col. (1998), quienes también estimaron las edades de los dos sub-grupos, U6a y U6b, en unos 30.000 y 27.000 años, respectivamente. En este trabajo, las edades calculadas para estos mismos clados son muy parecidas a las anteriores, añadiéndose además las estimadas para los sub-grupos U6a1 y U6b1, filogenéticamente más recientes (tabla 25).

Tabla 25. Edades (años) estimadas para el sub-haplogrupo U6 y sus sub-grupos, calculadas a partir de los polimorfismos de la RHVI.

	U6	U6a	U6b	U6a1	U6b1
Rando y col. (1998).	47.000	30.000	27.000	-	-
Macaulay y col. (1999).	51.000	-	-	-	-
Este trabajo.	46.000	27.000	24.000	13.000	6.000

5.2. Filogenia obtenida a partir de las secuencias completas.

La secuenciación completa de linajes divergentes, pertenecientes al sub-haplogrupo U6, nos ha permitido obtener una filogenia más fiable de este sub-haplogrupo (ver figura 13). En esta filogenia se confirma la existencia de los dos sub-grupos, U6a y U6b, encontrándose además mutaciones adicionales, pertenecientes a la región codificante, que los definen con mayor precisión. De esta forma, las transiciones 7805 y 14179 se encuentran en los todos los linajes U6a, y la 9438 en todos los U6b. Cabe destacar también que la secuenciación completa del individuo con la secuencia RVHI 172 219, considerado como representante del motivo ancestral, lo sitúa en una rama derivada dentro del sub-grupo U6a, lo que implica que este individuo pertenece a un linaje U6a que ha sufrido una retromutación en la posición 16278.

Edad del sub-haplogrupo U6.

La edad obtenida para el sub-haplogrupo U6, calculada a partir de las secuencias completas, se sitúa en torno a los 22.000 años, con un límite superior de 28.500, y un límite inferior de 13.300. Esta edad es bastante menor que la calculada a partir de la RHVI. Sin embargo, a tenor de lo publicado (Ingman y col., 2000), sería más fiable ya que, mientras que las mutaciones en la región codificante se acumulan a una tasa constante en los diferentes linajes, de acuerdo con la hipótesis del “reloj molecular”, las de la RHVI muestran una importante heterogeneidad, lo que hace a esta región menos adecuada para el cálculo de edades. Con respecto a los sub-grupos, la edad del U6a se sitúa en torno a los 22.000 años, con límites superior e inferior de 22.800 y 19.000 años, respectivamente. En cuanto al U6b, la edad estimada es de 8.500 años, con un margen superior de 13.300 y uno inferior de 3.800 años. Si por lo

anteriormente comentado, preferimos estas estimas a las basadas en la RHVI, tendremos que concluir que el clade U6a es filogenéticamente más antiguo que el U6b.

5.3. Origen y dispersión del sub-haplogrupo U6.

Los datos obtenidos de las secuencias U6 y su comparación con otras, pertenecientes a clados menos relacionados, sugieren un origen, para este sub-haplogrupo, en Oriente Próximo (Rando y col., 1998; Macaulay y col., 1999; Maca-Meyer y col., 2001). A partir de ahí, el U6 traza el primer retorno paleolítico a África (Maca-Meyer y col., 2001) siguiendo, probablemente, la costa mediterránea. Además, su presencia en el Noreste Africano confirma su expansión por todo el Norte de África. El hecho de que en Europa su presencia se encuentre limitada a la Península Ibérica descarta una posible “ruta europea”, a no ser que se haya producido una extinción total de los linajes en todo el trayecto (Maca-Meyer y col., 2001). También existe la posibilidad de que este sub-haplogrupo no haya salido de África, pero esto parece improbable por el hecho de que coalesce con haplogrupos que tuvieron expansiones importantes en Eurasia (Maca-Meyer y col., 2001). Las edades obtenidas para el U6 parecen indicar que este sub-haplogrupo fue un componente importante de los Iberomarusios, una cultura que se expandió desde Marruecos hasta Túnez hace 22.000-9.500 años (Newman, 1995). Este periodo incluiría la separación de los dos sub-grupos del U6. La presencia exclusiva del sub-grupo U6b1 en Canarias es más difícil de explicar. La edad obtenida para este sub-grupo es de unos 6.200 años, lo que implica que su formación probablemente tuvo lugar en el continente africano y no en el archipiélago, sobre todo, si tenemos en cuenta que las Islas fueron pobladas hace unos 2.000 años. El Sáhara experimentó un periodo húmedo hace unos 9.000 años (Alimen, 1987), lo que propició la entrada de poblaciones hacia esa zona (Newman, 1995). La posterior desertificación forzó su desplazamiento a zonas menos áridas, siendo, probablemente, los ancestros de las actuales tribus ganaderas y nómadas que viven en el Centro y Norte de África (Cavalli-Sforza y col., 1996). Estos movimientos poblacionales, en un periodo que abarca la edad de formación del U6b1, han podido provocar que la población africana donde se formó este linaje se encuentre, actualmente, en una zona muy distinta a la de antaño y no haya sido mostrada todavía.

5.4. El sub-haplogrupo U6 en la Península Ibérica.

Ya se ha comentado anteriormente que la Península Ibérica es la única zona europea en la que se encuentra el sub-haplogrupo U6. También se explicó que una llegada del U6 por la ruta norte, atravesando Europa, parece improbable, al no haberse detectado estos linajes en ninguna de las poblaciones de esa área. Por tanto, la entrada de estas secuencias debe haber sido, a través del Estrecho, desde el Norte de África. Se ha propuesto la hipótesis de que estos linajes entraron en la Península durante la ocupación árabe (Pereira y col., 2000). Si esto fuese así, se esperaría que el U6 se encontrara uniformemente repartido por todo el territorio peninsular o con una mayor incidencia en el sur, que fue el área donde la ocupación fue más prolongada. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, las secuencias pertenecientes a este sub-haplogrupo se concentran mayoritariamente en el norte (Pereira y col., 2000; González y col. 2002). Esto hace pensar que no todos los linajes U6 encontrados en la Península tienen un origen reciente, por ejemplo, algunos pueden haber llegado con la expansión neolítica africana. Además de la distribución geográfica, en apoyo de esta hipótesis, está el hecho de que los haplotipos peninsulares no suelen coincidir con los más comunes en el Norte de África y que la diversidad para el sub-haplogrupo U6 es mayor en la Península que en el Noroeste Africano. (González y col., 2002). Como ambas hipótesis no son excluyentes, lo más probable es que la presencia de los U6 en la Península se explique por influencias norteafricanas históricas y prehistóricas. Suponiendo que la frecuencia de U6 no ha variado en el Norte de África, que todos los U6 encontrados en la Península, exceptuando los U6b1, provienen de esta región y que la deriva genética no ha jugado un papel determinante, y utilizando la fórmula de migración de Bernstein (1931), explicada en el apartado 9.2.4 de Material y Métodos, obtenemos que un 17% del acervo genético materno peninsular tiene procedencia norteafricana. Este valor es intermedio entre el 14% que obtuvieron González y col. (2002) a partir de sus datos, y el 35% calculado a partir de los de Côrte-Real y col. (1996).

La presencia en la Península Ibérica del sub-grupo U6b1, restringido a las Islas Canarias y, por tanto, ausente en el Norte de África, podría ser explicada por el tráfico de esclavos guanches después de la Conquista. Admitiendo que la frecuencia de U6b1 en los esclavos guanches era la misma que la obtenida por nosotros en la muestra aborigen (7'7%), que este sub.grupo estaba ausente en la Península y que la

deriva genética no ha sido importante, y utilizando nuevamente la fórmula de Bernstein (1931), tendríamos que admitir que la influencia canaria en el acervo materno de la Península Ibérica es de un 2'5%, valor sorprendentemente alto si tenemos en cuenta los tamaños poblacionales de ambas áreas. Si, además, tenemos en cuenta que no todos los linajes U6b1 peninsulares se encuentran en Canarias, podríamos pensar que algunos U6b1 estaban en la Península antes de que Canarias fuese conquistada, pudiendo formar parte de los otros U6 que, en tiempos prehistóricos, llegaron desde África.

6. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE ESTE TRABAJO.

De los resultados obtenidos en este trabajo queda patente que, aunque la población Histórica de Santa Cruz no muestra diferencias significativas con la población actual de Tenerife, destaca por la abundancia de linajes subsaharianos (15'6%). Esto testimonia la importancia de este contingente en aquella época, aunque no hayan contribuido, en gran medida, al acervo genético actual, ya que estos linajes se encuentran hoy en un 6'8%. Las secuencias norteafricanas, representadas por el sub-haplogrupo U6, se encuentran en la muestra Histórica en un 10'15%. A pesar de que este componente ha descendido en la población actual de Tenerife (5'5%) se mantiene en la Canaria actual en un 14%.

Como era de esperar, la muestra aborígen se diferencia significativamente de la población Histórica y de la actual de Tenerife. La contribución de haplogrupos subsaharianos es muy baja y está limitada a algunos linajes L3. Este hecho confirma que el componente subsahariano entró en las Islas a raíz de la esclavitud. Los haplotipos norteafricanos pertenecientes al U6 se detectan en los aborígenes en un 9'2%, correspondiendo el 7'7% al linaje específico canario U6b1. Las estimas, para las dos poblaciones mayoritarias de la muestra aborígen, son de 5% y 16% para La Gomera y Tenerife, respectivamente. Al comparar la frecuencia del U6 de los aborígenes con la de la población Histórica se observa que son prácticamente iguales, por lo que este componente no ha sufrido importantes efectos de deriva. Esto habla en favor de que una mayoría de los linajes maternos son, efectivamente, de procedencia aborígen (Pinto y col., 1996a; Rando y col., 1999; Flores y col., 2001a). Minimizando los efectos de la deriva genética, la frecuencia relativa de secuencias U6a respecto a las U6b podría servir como una estima indirecta del impacto de la

esclavitud berberisca en las Islas. De esta forma se obtiene para los aborígenes una relación del 0'20, para la población Histórica una del 0'18, y para la población actual de Tenerife una relación de 0, al no encontrarse en ésta linajes pertenecientes al U6a. Esto demuestra que el impacto de este tipo de esclavitud en Tenerife tuvo consecuencias genéticas mínimas. Aplicando estos cálculos al resto de las Islas, se observa que las mayores influencias se detectan en las islas de El Hierro (0'5) y Lanzarote (0'25).

Más de un 55% de los linajes detectados en los aborígenes tienen su localización más cercana en el Magreb, lo que confirma su procedencia norteafricana, debilitando otros posibles orígenes. Sin embargo, sorprende que este porcentaje no incluya al sub-grupo U6b1, por lo que el origen concreto de los primeros pobladores canarios sigue siendo una incógnita. La siguiente área que más linajes comparte con los aborígenes es el Oriente Próximo con un 13'8%, lo que no es de extrañar si tenemos en cuenta que éste es el origen más probable de todas las poblaciones caucásicas del Norte de África.

Los trabajos realizados sobre la población canaria han utilizado distintas aproximaciones para calcular la pervivencia del sustrato aborígen en la población actual. De esta forma, se ha puesto de manifiesto una importante asimetría sexual, ya que mientras el componente principal materno es norteafricano, el paterno es preferentemente peninsular (Flores y col., 2001a). Excluyendo las estimas mínimas, basadas en el porcentaje de haplogrupos con una asignación geográfica concreta, los porcentajes promedios de diferentes estadísticos obtenidos para la población actual, elevan la contribución materna norteafricana a un 56% (tabla 26) dejando un valor del 26% procedente de la Península Ibérica, y otro, sorprendentemente alto, del 17% de contribución subsahariana. Aplicando los mismos estadísticos a la población Histórica, se observa que el componente norteafricano sigue siendo el mayoritario aunque el peninsular aumenta hasta un 40% (tabla 26).

Al obtener datos sobre la población aborígen de las Islas, ya no es necesario recurrir a la población norteafricana para inferir el componente aborígen. De esta forma, se pueden obtener estimas más fidedignas que las anteriores. Las contribuciones para la población Histórica se distinguen, de las estimaciones anteriores, por un considerable aumento del componente subsahariano, debido a que estos linajes se encuentran en el Norte de África pero no en los aborígenes. Nuevamente, esto confirma la importancia que tuvo la esclavitud en la población del

siglo XVIII. Con respecto a la población actual, se observa un descenso del componente subsahariano y un aumento del peninsular, lo que concuerda perfectamente con los datos históricos.

Tabla 26. Contribuciones relativas (%) en la población Histórica y actual, excluyendo las estimas basadas en la asignación geográfica de los haplogrupos.

	Norte de África	Península Ibérica	Subsáhara
Canarias actual¹	56'2 ± 9'0	26'3 ± 6'6	17'6 ± 2'5
Población Histórica	50'5 ± 4'9	40'2 ± 11'0	9'2 ± 6'1
	Aborígen	Península Ibérica	Subsáhara
Canarias actual	50'2 ± 7'3	43'2 ± 9'3	6'6 ± 2'0
Población Histórica	46'6 ± 5'5	38'5 ± 9'9	15'0 ± 4'5

¹Pinto y col., 1996a; Dupanloup y Bertorelle, 2001.

Además de los linajes U6, en trabajos anteriores (Rando y col., 1999) se consideraron otros linajes fundadores en la colonización aborígen, basándose en su distribución generalizada en todas las islas del archipiélago. Con nuestra muestra de aborígenes podemos confirmar que estas predicciones fueron muy acertadas, ya que de los ocho linajes fundadores propuestos cuatro han sido detectados en este trabajo y uno más en un estudio preliminar realizado por Rando (1998). Además, se han encontrado en los aborígenes seis linajes adicionales que se encuentran, actualmente, en alguna/as de las Islas Canarias.

Al ser el sub-grupo específico canario, U6b1, un componente importante de los aborígenes, es interesante situarlo dentro del contexto filogenético y geográfico del U6 africano. La red filogenética basada en las secuencias U6 disponibles (figura 12), muestra al U6b1 como una ramificación a partir del U6b. Curiosamente, este último se encuentra mejor representado en la Península Ibérica que en el Norte de África, donde sólo se detecta esporádicamente tanto en el Magreb como en el Sahel. Esto podría indicar que este linaje estuvo mejor representado en otra época que en la actualidad, y podría explicar por qué todavía no se ha encontrado el U6b1 en el Norte de África. Por el contrario, las secuencias U6a, que también están presentes en Canarias, se encuentran ampliamente distribuidas por todo el territorio norteafricano.

Tomando como edades más fiables las obtenidas a partir de la región codificante de las secuencias completas (Ingman y col., 2000), se ha demostrado que la edad del U6b (8.500 años) es menor que la del U6a (22.000 años), y que coincide con la expansión neolítica en el Sáhara (Newman, 1995). La posterior desertificación de la

zona redujo el tamaño poblacional, llevando a sus habitantes a refugiarse en zonas menos áridas. Esto es congruente con la presencia del U6b tanto en el norte (Magreb) como en el sur (Sahel) norteafricano, en la Península Ibérica y en Canarias. Obviamente, otros linajes U6 han tenido que acompañar al U6b, como ha quedado demostrado por la presencia de U6a en los aborígenes canarios. Sin embargo, el hecho de que linajes idénticos a los encontrados en Canarias se encuentren distribuidos por toda la región africana, tampoco permite obtener una localización exacta del lugar de origen de los primeros pobladores canarios.

V. CONCLUSIONES

Este trabajo puede resumirse en las siguientes conclusiones:

1. La población Histórica de Santa Cruz de Tenerife no se diferencia significativamente de las poblaciones actuales de Tenerife y Canarias.
2. El componente subsahariano encontrado en la población Histórica alcanza un 15'6%, lo que testimonia la importancia que tuvo el tráfico de esclavos negros tras la Conquista. Sin embargo, no todas estas secuencias han contribuido de forma importante al acervo genético actual, donde los linajes subsaharianos sólo representan un 6'8%.
3. El componente norteafricano, determinado por la presencia de linajes U6, se sitúa en torno a un 10% en la población Histórica, que es el doble del que se encuentra actualmente en Tenerife (5'5%).
4. La muestra aborígen se diferencia significativamente de la población Histórica y de la actual.
5. La presencia de haplogrupos subsaharianos en los aborígenes es muy baja, limitándose a linajes L3. Esto confirma la entrada, en Canarias, de dichos linajes tras la Conquista.
6. La frecuencia del sub-haplogrupo U6 norteafricano en los aborígenes es del 9'2%, encontrándose el específico canario, U6b1, en un 7'7%. Esta frecuencia es muy parecida a la encontrada en la población Histórica, lo que implica que el efecto de deriva genética no ha sido importante, y que una mayoría de los linajes maternos tienen procedencia aborígen.
7. El impacto de la esclavitud berberisca no tuvo consecuencias genéticas importantes en Tenerife, encontrándose las mayores influencias de esa área en las islas de El Hierro y Lanzarote.

8. Un 55% de los linajes aborígenes tienen sus homólogos más cercanos en el Magreb confirmando así su procedencia norteafricana occidental. Sin embargo, éstos no incluyen a los U6b1 por lo que el origen concreto de los primeros pobladores sigue siendo una incógnita.

9. El estudio de los aborígenes ha permitido realizar estimas de mezcla más fidedignas. Para la población Histórica se obtiene un componente mayoritario aborigen del 46'5%, uno peninsular del 38'5% y un 15% subsahariano. Para la población actual canaria se mantiene el componente aborigen (50'2%), mientras que el peninsular aumenta a un 43'2%, y el subsahariano desciende a un 6'6%, lo que concuerda con los datos históricos de la colonización.

10. En la muestra aborigen se han confirmado cuatro de los ocho haplotipos fundadores propuestos en trabajos anteriores. Además, se han encontrado seis secuencias adicionales que persisten hoy en día, por lo menos, en alguna de las Islas.

11. La distribución geográfica de los linajes U6 revela que el U6b se encuentra, hoy en día, mejor representado en la Península Ibérica que en el Norte de África, lo que podría explicar por qué no se ha detectado, todavía, el U6b1 en el continente africano.

12. Las secuencias pertenecientes al sub-grupo U6a, presentes también en Canarias, se encuentran ampliamente distribuidas por el territorio norteafricano, lo que impide asignarles un origen concreto.

13. Las edades obtenidas a partir de las secuencias completas de los linajes U6, demuestran una mayor antigüedad del sub-grupo U6a (22.000 años) respecto al U6b (8.500 años).

14. La edad obtenida para el sub-grupo U6b (8.500 años) coincide con la expansión neolítica en el Sáhara. La presencia de estos linajes en el Magreb, el Sahel, la Península Ibérica y Canarias es congruente con el poblamiento de zonas menos áridas tras la desecación del Sáhara.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adcock, G.J., Dennis, E.S., Eastal, S., Huttley, G.A., Jermin, L.S., Peacock, W.J., Thorne, A. (2001). Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: implications for modern human origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 537-542.
- Afonso, J.M., Hernández, M., Larruga, J.M., Cabrera, V., González, A.M. (1989). Human enzyme polymorphism on the Canary Islands III. Tenerife Island population. *Hum Biol.* 61: 543-549.
- Akane, A., Seki, S., Shinono, H., Nakamura, H., Hasegawa, M., Kagawa, M., Matsubara, K., Nakahori, Y., Nagafuchi, S., Nakagome, Y. (1992). Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene. *Forensic Sci. Int.* 52: 143-148.
- Alimen, H. (1987). Evolution du climat et des civilisations depuis 40.000 ans du nord au sud du Sahara Occidental. (Premières conceptions confrontées aux données récentes). *Bulletin de L'Association française pour l'étude du Quaternaire*. 4: 215-227.
- Allard, M.W., Young, D., Huyen, Y. (1995). Detecting dinosaur DNA. *Science*. 268: 1192.
- Alves-Silva, J., da Silva Santos, M., Guimarães, P. E. M., Ferreira, A. C. S., Bandelt, H. J., Pena, S. D. J., Ferreira Prado, V. (2002). The ancestry of Brazilian lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 444-461.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., Bruijn, M.H.L.D.E., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.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. *Nature Genetics*. 23: 147.
- Anzai, T., Naruse, T.K., Tokunaga, K., Honma, T., Baba, H., Akazawa, T., Inoko, H. (1999). HLA genotyping of 5,000- and 6,000-year-old ancient bones in Japan. *Tissue Antigens*. 54: 53-58.
- Arco Aguilar, M.C., Hernández Pérez, M., Jiménez Gómez, M.C., Navarro Mederos, J.F. (1981). Nuevas fechas de C-14 en la prehistoria de Gran Canaria. *El Museo Canario*. 38-40: 73-78.

- Arco Aguilar, M.C., Navarro Mederos, J.F. (1987). *Historia Popular de Canarias. Vol. 1. Los Aborígenes*. C.C.P.C. S/C de Tenerife.
- Arco Aguilar, M.C., Arco Aguilar, M., Atiénzar Armas, E., Atoche Peña, P., Martín Oval, M., Rodríguez Martín, C., Rosario Adrián, M.C. (1997). Dataciones absolutas en la prehistoria de Tenerife. Homenaje a Celso Martín de Guzmán, Las Palmas de Gran Canaria: 5-19.
- Arriaza, B.T., Salo, W., Aufderheide, A.C., Holcomb, T.A. (1995). Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98: 37-45.
- Austin, J.J., Ross, A.J., Smith, A.B., Fortney, R.A., Thomas, R.H. (1997a). Problems of reproducibility- does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? *Proc. R. Soc. Lond. B.* 264: 467-474.
- Austin, J.J., Smith, A.B., Thomas, R.H. (1997b). Palaeontology in a molecular world: the search for authentic DNA. *TREE.* 12: 303-306.
- Aznar-Vallejo, E. (1991). *Población y sociedad en la época realenga. Historia de Canarias*. I. Editorial Prensa Ibérica S.A.
- Aznar-Vallejo, E. (1992). La integración de las Islas Canarias en la Corona de Castilla (1478-1526). Cabildo Insular de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria.
- Aznar-Vallejo, E. (1996). Colonización. En *Gran Enciclopedia Canaria*, IV, Edirca, Las Palmas de Gran Canaria: 1053-1056.
- Bachmann, L., Scholz, M., Broghammer, M., Giddings, I., Pusch, C.M. (2000). Voltage-induced release of nucleic acids from palaeontological samples. *Electrophoresis.* 21: 1488-1492.
- Bailey, J.F., Henneberg, M., Colson, I.B., Ciarallo, A., Hedges, R.E.M., Sykes, B. (1999). Monkey business in Pompeii-Unique find of a juvenile Barbary Macaque skeleton in Pompeii identified using osteology and ancient DNA techniques. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1410-1414.
- Bandelt, H-J., Forster, P., Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Bandelt, H-J., Lahermo, P., Richards, M., Macaulay, V. (2001). Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis. *Int. J. Legal. Med.* 115: 64-69.
- Béraud-Colomb, E., Roubin, R., Martin, J., Maroc, N., Gardeisen, A., Trabuchet, G., Goossens, M. (1995). Human β -globin gene polymorphisms characterized in

- DNA extracted from ancient bones 12,000 years old. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 1267-1274.
- Béraud-Colomb, E., Roubin, R., Martin, J., Maroc, N., Gardeisen, A., Trabuchet, G., Goossens, M. (1997). Reply to Cooper. *Am. J. Hum. Genet.* 60:1002-1003.
- Bernstein, F. (1931). Die geographische Verteilung der Blutgruppen und ihre anthropologische Bedeutung. En: *Comitato Italiano per o studio dei problemi della popolazione*. Instituto Poligrafico dello Stato, Roma. 227-243.
- Bertorelle, G., Excoffier, L. (1998). Inferring Admixture proportions from molecular data. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1298-1311.
- Béthencourt Massieu (1995). (Ed) *Historia de Canarias*. Cabildo Insular de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria.
- Brakez, Z., Bosch, E., Izaabel, H., Akhayat, O., Comas, D., Bertranpetit, J., Calafell, F. (2001). Human mitochondrial DNA sequence variation in the Moroccan population of the Souss area. *Ann. Hum. Biol.* 28: 295-307.
- Bravo, A.M., de las Casas, M.T. (1958). Distribución de grupos sanguíneos en los habitantes de la isla de La Palma. *Acta Médica de Tenerife.* 10: 114-117.
- Burger, J., Hummel, S., Herrmann, B., Henke, W. (1999). DNA preservation: a microsatellite study on ancient skeletal remains. *Electroforesis.* 20: 1722-1728.
- Burgess, L.C., Hall, J.O. (1999). UV light irradiation of plastic reaction tubes inhibits PCR. *BioTechniques.* 27: 252-256.
- Cabrera, V.M., González, P., Salo, W.L. (1996). Human enzyme polymorphism on the Canary Islands VII. G6PD Seattle in Canarians and North African Berbers. *Human Hered.* 46: 197-200.
- Cabrera-Pérez, J.C. (1991). El Redescubrimiento. En: *Historia de Canarias I*. Ed. Prensa Ibérica, S.A. 98.
- Cali, F., Le Roux, M.G., D'Anna, R., Flugy, A., De Leo, G., Chiavetta, V., Ayala, G.F., Romano, V. (2001). MtDNA control region and RFLP data for Sicily and France. *Int. J. Leg. Med.* 114: 229-231.
- Camps-Fabrer, H. (1989). Capsien et Natoufien au Proche-Orient. Colloque "L'homme maghrébin et son environnement depuis 100.000 ans" Maghnia (Algérie) et Trav. du LAPMO: 71-104.
- Cano, R.J., Poinar, H., Poinar, G.O. (1992). Isolation and partial characterisation of DNA from the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) in 25-40 million year old amber. *Med. Sci. Res.* 20: 249-251.

- Cano, R.J., Poinar, H.N., Pieniazek, N.J., Acra, A., Poinar, G.O. (1993). Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million year old weevil. *Nature*. 363: 536-538.
- Carlyle, S.W., Parr, R.L., Hayes, G., O'Rourke, D.H. (2000). Context of maternal lineages in the Greater Southwest. *Am. J. Phys. Anthropol.* 113: 85-101.
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P., Piazza, A. (1996). The history and geography of human genes. Princeton University Press. Princeton.
- Chen, Y.S., Torroni, A., Excoffier, L., Santachiara-Benerecetti, A.S., Wallace, D.C. (1995). Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all continent-specific haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 133-149.
- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R., Wilfinger, W. (1997). DNAzol[®]: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques*. 22: 550-553.
- Cioranescu, A. (1998). *Historia de Santa Cruz de Tenerife I (1494-1803)*. Servicio de publicaciones de la Caja General de Ahorros de Canarias (Nº 207).
- Comas, D., Calafell, F., Bendukidze, N., Fañanás, L., Bertranpetit, J. (2000). Georgian and Kurd mtDNA sequence analysis shows a lack of correlation between languages and female genetic lineages. *Am. J. Phys. Anthropol.* 112: 5-16.
- Cooper, A., Mourer-Chauviré, C., Chambers, G.K., von Haeseler, A., Wilson, A.C., Pääbo, S. (1992). Independent origins of New Zealand moas and kiwis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 8741-8744.
- Cooper, A., Wayne, R. (1998). New uses for old DNA. *Current Opinion in Biotechnology*. 9: 49-53.
- Cooper, A., Poinar, H.N. (2000). Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science*. 289: 1139.
- Cooper, A., Lalueza-Fox, C., Anderson, S., Rambaut, A., Austin, J., Ward, R. (2001). Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature*. 409: 704-707.
- Côrte-Real, H.B.S.M., Macaulay, V.A., Richards, M.B., Hariti, G., Issad, M.S., Cambon-Thomsen, A., Papiha, S., Bertranpetit, J., Sykes, B. (1996). Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann. Hum. Genet.* 60: 331-350.

- Crespillo, M., Luque, J.A., Paredes, M., Fernández, R., Ramírez, E., Valverde, J.L. (2000). Mitochondrial DNA sequences for 118 individuals from northeastern Spain. *Int. J. Legal Med.* 114: 130-132.
- DeSalle, R., Gatesy, J., Wheeler, W., Grimaldi, D. (1992). DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science.* 257: 1933-1936.
- Di Benedetto, G., Nasidze, I.S., Stenico, M., Nigro, L., Krings, M., Lanzinger, M., Vigilant, L., Stoneking, M., Pääbo, S., Barbujani, G. (2000). Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the Alps. *Eur. J. Hum. Genet.* 8: 669-677.
- Di Rienzo, A., Wilson, A.C. (1991). Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 1597-1601.
- Díaz Padilla, G. y Rodríguez Yanes, J.M. (1990). El señorío en las Canarias Occidentales. La Gomera y El Hierro hasta 1700. Cabildo Insular de El Hierro, Cabildo Insular de La Gomera, Sta. Cruz de Tenerife.
- Drancourt, M., Aboudharam, G., Signoli, M., Dutour, O., Raoult, D. (1998). Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12637-12640.
- Dupanloup, I., Bertorelle, G. (2001). Inferring admixture proportions from molecular data: extension to any number of parental populations. *Mol. Biol. Evol.* 18: 672-675.
- Esteban, E., Dugoujon, J.M., Valveny, N., González-Reimers, E., Moral, P. (1998). Spanish and African contribution to the genetic pool of the Canary islanders: data from GM and KM haplotypes and RFLPs in the immunoglobulin IGHG loci. *Ann. Hum. Genet.* 62: 33-45.
- Faerman, M., Filon, D., Kahila, G., Greenblatt, C.L., Smith, P., Oppenheim, A. (1995). Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene.* 167: 327-332.
- Ferreira, L.F., Britto, C., Cardoso, M.A., Fernandes, O., Reinhard, K., Araújo, A. (2000). Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Tropica.* 75: 79-84.

- Filon, D., Faerman, M., Smith, P., Oppenheim, A. (1995). Sequence analysis reveals a β -thalassaemia mutation in the DNA of skeletal remains from the archaeological site of Akhziv, Israel. *Nature Genetics*. 9: 365-368.
- Fischer, G.F., Fae, I., Mann, D., Kriks, D., Jäger, W., Platzer, W., Mayr, W.R., Volc-Platzer, B. (2001). An HLA class-II allele frequent in Eskimos and Amerindians is found in the Tyrolean Ice Man. *Ann. Hum. Genet.* 65: 363-369.
- Flores, C., Maca-Meyer, N., González, A.M., Cabrera, V.M. (2000). Northwest African distribution of the CD4/Alu microsatellite haplotypes. *Ann. Hum. Genet.* 64: 321-327.
- Flores, C. (2001). Composición genética y posible origen paterno de las poblaciones humanas canarias, deducidos de su polimorfismo en el cromosoma Y. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, Tenerife.
- Flores, C., Larruga, J.M., González, A.M., Hernández, M., Pinto, F.M., Cabrera, V.M. (2001a). The origin of the Canary Island aborigines and their contribution to the modern population: a molecular genetics perspective. *Current Anthropology*. 42: 749-755.
- Flores, C., Maca-Meyer, N., Pérez, J.A., Cabrera, V.M. (2001b). The peopling of the Canary Islands: a CD4/Alu microsatellite haplotype perspective. *Hum. Immunol.* 62: 949-953.
- Flores, C., Maca-Meyer, N., Pérez, J.A., González, A.M., Larruga, J.M., Cabrera, V.M. (2003). A predominant European ancestry of paternal lineages from Canary Islanders. *Ann. Hum. Genet.* En prensa.
- 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.
- Fox, J.C., Ait-Khaled, M., Webster, A., Emery, V.C. (1991). Eliminating PCR contamination: is UV irradiation the answer? *J. Virol. Methods*. 33:375-382.
- Fusté, M. (1958-59). Algunas observaciones acerca de la antropología de la poblaciones prehistórica y actual de Gran Canaria. Publicaciones del Museo Canario. 1-27.
- Gerstenberger, J., Hummel, S., Schultes, T., Häck, B., Herrmann, B. (1999). Reconstruction of a historical genealogy by means of STR analysis and Y-haplotyping of ancient DNA. *Eur. J. Hum. Genet.* 7: 469-477.

- Ginther, C., Issel-Tarver, L., King, M-C. (1992). Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics*. 2:135-138.
- Golenberg, E.M., Giannasi, D.E., Clegg, M.T., Smiley, C.J., Durbin, M., Henderson, D. (1990). Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature*. 344: 656-658.
- González, A.M., Brehm, A., Pérez, J.A., Maca-Meyer, N., Flores, C., Cabrera, V.M. (2002). Mitochondrial DNA affinities at the Atlantic fringe of Europe. *Am. J. Phys. Anthropol.* En prensa.
- González-Oliver, A., Márquez-Morfín, L., Jiménez, J.C., Torre-Blanco, A. (2001). Founding amerindian mitochondrial DNA lineages in ancient Maya from Xcaret, Quintana Roo. *Am. J. Phys. Anthropol.* 116: 230-235.
- Graven, L., Passarino, G., Semino, O., Boursit, P., Santachiara-Benerecetti, A.S., Langaney, A., Excoffier, L. (1995). Evolutionary correlation between control region sequence and restriction polymorphisms in the mitochondrial genome of a large Senegalese Mandenka sample. *Mol. Biol. Evol.* 12: 334-345.
- Greenwood, A.D., Capelli, C., Possnert, G., Pääbo, S. (1999). Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1466-1473.
- Greenwood, A.D., Castresana, J., Feldmaier-Fuchs, G., Pääbo, S. (2001). A molecular phylogeny of two extinct sloths. *Mol. Phyl. Evol.* 18: 94-103.
- Guasch, J., Florensa, G., Díaz de Yraola, G., Gavilanes, C., del Río, R., Tabuenca, J., Raichs, A. (1952). Los factores hemáticos en España, excepto en el País Vasco. *Medicina Clínica*. 18: 268-271.
- Gutiérrez, G., Sánchez, D., Marín, A. (2002). A Reanalysis of the ancient mitochondrial DNA sequences recovered from Neandertal bones. *Mol. Biol. Evol.* 19: 1359-1366.
- Hagelberg, E., Sykes, B., Hedges, R. (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature*. 342: 485.
- Hagelberg, E., Bell, L.S., Allen, T., Boyde, A., Jones, S.J., Clegg, J.B. (1991). Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 333: 399-407.
- Hagelberg, E., Clegg, J.B. (1991). Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. R. Soc. London B.* 244: 45-50.
- Hagelberg, E., Thomas, M.G., Cook Jr, C.E., Sher, A.V., Baryshnikov, G.F., Lister, A.M. (1994). DNA from ancient mammoth bones. *Nature*. 370: 333-334.

- Hammer, M.F., Karafet, T.M., Redd, A.J., Jarjanazi, H., Santachiara-Benerecetti, S., Soodyall, H., Zegura, S.L. (2001). Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1189-1203.
- Handt, O., Höss, M., Krings, M., Pääbo, S. (1994a). Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia.* 50: 524-529.
- Handt, O., Richards, M., Trommsdorf, M., Kilger, C., Simanainen, J., Georgiev, O., Bauer, K., Stone, A., Hedges, R., Schaffner, W., Utermann, G., Sykes, B., Pääbo, S. (1994b). Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science.* 264: 1775-1778.
- Handt, O., Krings, M., Ward, R.H., Pääbo, S. (1996). The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 368-376.
- Hardy, C., Callou, C., Vigne, J.-D., Casane, D., Dennebouy, N., Mounolou, J.-C., Monnerot, M. (1995). Rabbit mitochondrial DNA diversity from prehistoric to modern times. *J. Mol. Evol.* 40: 227-237.
- Hänni, C., Brousseau, T., Laudet, V., Stehelin, D. (1995). Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acids Research.* 23: 881-882.
- Hedges, S.B., Schweitzer, M.H. (1995). Detecting dinosaur DNA. *Science.* 268: 1191-1192.
- Helgason, A., Hickey, E., Goodacre, S., Bosnes, V., Stefánsson, K., Ward, R., Sykes, B. (2000). mtDNA and the Islands of the North Atlantic: estimating the proportions of Norse and Gaelic ancestry. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 723-737.
- Henikoff, S. (1995). Detecting dinosaur DNA. *Science.* 268:1192.
- Hernández, P. (1999). *Natura y Cultura de las Islas Canarias*. Tafor publicaciones, S.L. La Laguna-Tenerife. Pag. 271-276.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O., Wilson, A.C. (1984). DNA sequences from a quagga, an extinct member of the horse family. *Nature.* 312: 282-284.
- Higuchi, R.G., Wrischnik, L.A., Oakes, E., George, M., Tong, B., Wilson, A.C. (1987). Mitochondrial DNA of the extinct quagga: relatedness and extent of postmortem change. *J. Mol. Evol.* 25: 283-287.
- Hofmann, S., Jaksch, M., Bezold, R., Mertens, S., Aholt, S., Paprotta, A., Gerbitz, K.D. (1997). Population genetics and disease susceptibility: characterization

- of Central European haplogroups y mtDNA gene mutations, correlations with D loop variants and association with disease. *Hum. Mol. Genet.* 6: 1835-1846.
- Hofreiter, M., Poinar, H.N., Spaulding, W.G., Bauer, K., Martin, P.S., Possnert, G., Pääbo, S. (2000). A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. *Molecular Ecology.* 9: 1975-1984.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., von Haessler, A., Pääbo, S. (2001a). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res.* 29: 4793-4799.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M., Pääbo, S. (2001b). Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics.* 2:353-359.
- 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-Hattori, Y., Hayashi, S., Sonoda, S., Tajima, K. (1993). Peopling of the americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10: 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: 579-590.
- Höss, M., Pääbo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21: 3913-3914.
- Höss, M., Pääbo, S., Vereshchagin, N.K. (1994). Mammoth DNA sequences. *Nature.* 370: 333.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T.H., Dizdaroglu, M., Pääbo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* 24: 1304-1307.
- Höss, M. (2000). Neanderthal population genetics. *Nature.* 404: 453-454.
- Hummel, S., Herrmann, B., (1991). Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften.* 78: 266-267.
- Hummel, S., Schultes, T., Bramanti, B., Herrmann, B. (1999). Ancient DNA profiling by megaplex amplications. *Electrophoresis.* 20: 1717-1721.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S., Gyllensten, U. (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 408: 708-713.

- Izagirre, N., Duran, L.M., de la Rúa, C. (1998). Genética y Arqueología: Análisis molecular de ADN procedente de restos esqueléticos. *Munibe*. 50: 3-14.
- Izagirre, N., de la Rúa, C. (1999). An mtDNA analysis in ancient Basque populations: implications for haplogroup V as a marker for a major paleolithic expansion from southwestern Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 199-207.
- Jehaes, E., Pfeiffer, H., Toprak, K., Decorte, R., Brinkmann, B., Cassiman, J.J. (2001). Mitochondrial DNA analysis of the putative heart of Louis XVII, son of Louis XVI and Marie-Antoinette. *Eur. J. Hum. Genet.* 9: 185-190.
- Jobling, M.A., Tyler-Smith, C. (1995). Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet.* 11: 449-456.
- Jorge, S. (1996). Las navegaciones por la costa atlántica africana y las Islas Canarias en la Antigüedad. Estudios prehispanicos 4. Dirección General de Patrimonio Histórico, Sta. Cruz de Tenerife.
- Kaestle, F.A., Smith, D.G. (2001). Ancient mitochondrial DNA evidence for prehistoric population movement: the numic expansion. *Am. J. Phys. Anthropol.* 115: 1-12.
- Kalmár, T., Bachrati, C.Z., Marcsik, A., Raskó, I. (2000). A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Research*. 28: e67, i-iv.
- Kolman, C.J., Tuross, N. (2000). Ancient DNA analysis of human populations. *Am. J. Phys. Anthropol.* 111: 5-23.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Stoneking, M., Pääbo, S. (1997). Neandertal DNA sequence and the origin of modern humans. *Cell*. 90: 19-30.
- Krings, M., Geisert, H., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Pääbo, S. (1999a). DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 5581-5585.
- Krings, M., Salem, A.H., Bauer, K., Geisert, H., Malek, A.K., Chaix, L., Simon, C., Welsby, D., Di Rienzo, A., Utermann, G., Sajantila, A., Pääbo, S., Stoneking, M. (1999b). mtDNA analysis of Nile River Valley populations: A genetic corridor or a barrier to migration? *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1166-76.

- Krings, M., Capelli, C., Tschentscher, F., Geisert, H., Meyer, S., von Haessler, A., Grossschmidt K., Possnert G., Paunovic, M., Pääbo, S. (2000). A view of Neandertal genetic diversity. *Nature Genetics*. 26: 144-146.
- Kurosaki, K., Matsushita, T., Ueda, S. (1993). Individual DNA identification from ancient human remains. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 638-643.
- Lalueza Fox, C. (1996a). Analysis of ancient mitochondrial DNA from extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Ancient Biomolecules*. 1: 43-54.
- Lalueza Fox, C. (1996b). Mitochondrial DNA haplogroups in four tribes from Tierra del Fuego-Patagonia: inferences about the peopling of the Americas. *Hum. Biol.* 68: 855-871.
- Lalueza Fox, C. (1997). MtDNA analysis in ancient Nubians supports the existence of gene flow between sub-Saharan and North Africa in the Nile valley. *Ann. Hum. Biol.* 24: 217-227.
- Lalueza-Fox, C., Bertranpetit, J., Alcover, J.A., Shailer, N., Hagelberg, E. (2000). Mitochondrial DNA from *Myotragus balearicus*, an extinct bovid from the Balearic Islands. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*. 288: 56-62.
- Lalueza Fox, C., Luna Calderón, F., Calafell, F., Morera, B., Bertranpetit, J. (2001). MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean. *Ann. Hum. Genet.* 65: 137-151.
- Larraz Mora, A., González Marrero, M.C. (1995). Estudio documental de la Parroquia de Nuestra Señora de la Concepción de Santa Cruz de Tenerife. En Arnay y col. Excavación Arqueológica en la Iglesia de Nuestra Señora de la Concepción. *Investigaciones Arqueológicas en Canarias 4*. Santa Cruz de Tenerife. 232-246.
- Larruga, J.M., Díez, F., Pinto, F.M., Flores, C., González, A.M. (2001) Mitochondrial DNA characterisation of European isolates: The maragatos from Spain. *Eur. J. Hum. Genet.* 9: 708-716.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 362: 709-715.
- Long, J.C. (1991). The genetic structure of admixed populations. *Genetics*. 127: 417-428.

- Maca-Meyer, N., González, A.M., Larruga, J.M., Flores, C., Cabrera, V.M. (2001). Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. *BMC Genetics*. 2:13.
- Macaulay, V., Richards, M., Hickey, E., Vega, E., Cruciani, F., Guida, V., Scozzari, R., Bonn -Tamir, B., Sykes, B., Torroni, A. (1999). The emerging tree of west Eurasian mtDNAs: A synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 232-249.
- Macías Hernández, A., Bravo de Laguna, J.M. (1997). Conquista. En Gran Enciclopedia Canaria, V, Edirca, Las Palmas de Gran Canaria: 1110-1117.
- Malcorra, J.J., Balda, M.I., Díaz, J.M. (1990). A survey of structural hemoglobinopathies in the Canary Islands. *Hemoglobin*. 14: 477-478.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Marota, I., Rollo, F. (2002). Molecular Paleontology. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 97-111.
- Marrero, M. (1966). La esclavitud en Tenerife a raíz de la Conquista. Instituto de Estudios Canarios, La Laguna, Tenerife.
- Martell, M., Padr n, G., Hernández, M., Afonso, J.M., Cabrera, V. (1986). Human enzyme polymorphism on the Canary Islands I. Gran Canaria Island population. *Human Heredity*. 36: 41-44.
- Mateu, E., Comas, D., Calafell, F., Pérez-Lezaun, A., Abade, A., Bertranpetit, J. (1997). A tale of two islands: population history and mitochondrial DNA sequence variation of Bioko and São Tomé, Gulf of Guinea. *Ann. Hum. Genet.* 61: 507-18.
- Matisoo-Smith, E., Allen, J.S., Ladefoged, T.N., Roberts, R.M., Lambert, D.M. (1997). Ancient DNA from Polynesian rats: Extraction, amplification and sequence from single small bones. *Electrophoresis*. 18: 1534-1537.
- Mays, S., Taylor, G.M., Legge, A.J., Young, D.B., Turner-Walker, G. (2001). Paleopathological and biomolecular study of tuberculosis in a Medieval skeletal collection from England. *Am. J. Phys. Anthropol.* 114: 298-311.
- Meyer, E., Wiese, M., Bruchhaus, H., Claussen, M., Klein, A. (2000). Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. *Forensic. Sci. Int.* 113: 87-90.

- Monsalve, M.V., Cardenas, F., Guhl, F., Delaney, A.D., Devine, D.V. (1996). Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. *Ann. Hum. Genet.* 60: 293-303.
- Monsalve, M.V., Hagelberg, E. (1997). Mitochondrial DNA polymorphisms in Carib people of Belize. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 264: 1217-1224.
- Montiel, R., Malgosa, A., Subirà, E. (1997). Overcoming PCR inhibitors in ancient DNA extracts from teeth. *Ancient Biomolecules.* 1: 221-225.
- Montiel, R., Malgosa, A., Francalacci, P. (2001). Authenticating ancient human mitochondrial DNA. *Hum. Biol.* 73: 689-713.
- Moral, P., Esteban, E., Vives, S., Valveny, N., Toja, D.I., González-Reimers, E. (1997). Genetic study of the population of Tenerife (Canary Islands, Spain): protein markers and a review of classical polymorphisms. *Am. J. Phys. Anthropol.* 102: 337-349.
- Morilla, J.M., Afonso, J.M., Hernández, M., Pestano, J.M., Larruga, J.M. (1988). Human enzyme polymorphism on the Canary Islands II. African Influence. *Human Hered.* 38: 101-105.
- Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Giménez, J., Reis, A., Varon-Mateeva, R., Macek, M., Kalaydjieva, L., Angelicheva, D., Dancheva, R., Romeo, G., Russo, M.P., Garnerone, S., Restagno, G., Ferrari, M., Magnani, C., Claustres, M., Desgeorges, M., Schwartz, M., Dallapiccola, B., Novelli, G., Ferec, C., de Arce, M., Nemeti, M., Kere, J., Anvret, M., Dahl, N., Kadasi, L. (1994). The origin of the major cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) in European populations. *Nature Genetics.* 7: 169-175.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Nakahori, Y., Hamamo, K., Iwaya, M., Nakagome, Y. (1991a). Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primers. *Am. J. Med. Genet.* 39: 472-473.
- Nakahori, Y., Takenaka, O., Nakagome, Y. (1991b). A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics.* 9: 264-269.
- Navarro, J.F., Martín, E., Rodríguez, A. (1990). La primera etapa del programa de excavaciones en La Cueva de San Juan y su aportación a la diacronía de la prehistoria de La Palma. *Inves. Arqueol. Canarias.* 2: 189-200.

- Navarro Mederos, J.F. (1997). Arqueología de las Islas Canarias. Espacio, tiempo y forma. Serie I, Prehistoria y Arqueología, 10: 447-478.
- Nei, M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. New York. Columbia University Press.
- Newman, J.L. (1995). The peopling of Africa: a geographic interpretation. Yale University.
- Ohira, H., Yamada, Y. (1999). Advantages of dental mitochondrial DNA for detection and classification of the sequence variation using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Forensic. Med. Pathol.* 20:261-268.
- Oota, H., Saitou, N., Matsushita, T., Ueda, S. (1995). A genetic study of 2000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98: 133-145.
- Ovchinnikov, I.V., Ovtchinnikova, O.I., Druzina, E.B., Buzhilova, A.P., Makarov, N.A. (1998). Molecular genetic sex determination of Medieval human remains from North Russia: Comparison with archaeological and anthropological criteria. *Anthrop. Anz.* 56: 7-15.
- Ovchinnikov, I.V., Götherström, A., Romanova, G.P., Kharitonov, V.M., Lidén, K., Goodwin, W. (2000). Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature.* 404: 490-493.
- Pääbo, S. (1985a). Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies. *J. Archaeol. Sci.* 12: 411-417.
- Pääbo, S. (1985b). Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature.* 314: 644-645.
- Pääbo, S. (1986). Molecular genetic investigations of ancient human remains. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 51: 441-446.
- Pääbo, S., Higuchi, R.G., Wilson, A.C. (1989). Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *J. Biol. Chem.* 264 (17): 9709-9712.
- Pääbo, S., Wilson, A.C. (1991). Miocene DNA sequences- a dream come true? *Curr. Biol.* 1: 45-46.
- Parejo, M. (1966). El sistema AB0 en la población actual de las Islas Canarias. *Actas del V Congreso Panafricano de prehistoria y estudios del Cuaternario. II:* 213-217.

- Parr, R.L., Carlyle, S.W., O'Rourke, D.H. (1996). Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands. *Am. J. Phys. Anthropol.* 99: 507-518.
- Passarino, G., Semino, O., Bernini, L.F., Santachiara-Benerecetti, A.S. (1996). Precaucasoid and Caucasoid genetic features of the Indian population, revealed by mtDNA polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 927-934.
- Pereira, L., Prata, M.J., Amorim, A. (2000). Diversity of mtDNA lineages in Portugal: Not a genetic edge of European variation. *Ann. Hum. Genet.* 64: 491-506.
- Pereira, L., Macaulay, V., Torroni, A., Scozzari, R., Prata, M.-J., Amorim, A. (2001). Prehistoric and historic traces in the mtDNA of Mozambique: insights into the Bantu expansions and the slave trade. *Ann. Hum. Genet.* 65: 439-458.
- Pérez, M.J., Hierro, J.M., Marrero, M.J., González, A.M., Cabrera, V.M. (1991). Human enzyme polymorphism on the Canary Islands IV. Eastern Islands. *Human Hered.* 41: 385-390.
- Piercy, R., Sullivan, K.M., Benson, N., Gill, P. (1993). The application of mitochondrial DNA typing to study of white Caucasian genetic identification. *Int. J. Leg. Med.* 106: 85-90.
- Pinto, F., Cabrera, V.M., González, A.M., Larruga, J.M., Noya, A., Hernández, M. (1994). Human enzyme polymorphism on the Canary Islands VI. Northwest African influence. *Hum. Hered.* 44: 156-161.
- Pinto, F., González, A.M., Hernández, M., Larruga, J.M., Cabrera, V.M. (1996a). Genetic relationship between the Canary Islanders and their African and Spanish ancestors inferred from mitochondrial DNA sequences. *Ann. Hum. Genet.* 60: 321-330.
- Pinto, F., Rando, J.C., López, M., Morilla, J.M., Larruga, J.M. (1996b). Blood group polymorphisms in the Canary Islands. *Gene Geography.* 10: 171-179.
- Poinar, H.N., Höss, M., Bada, J.L., Pääbo, S. (1996). Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science.* 272: 864-866.
- Poinar, H.N., Hofreiter, M., Spaulding, W.G., Martin, P.S., Stankiewicz, B.A., Bland, H., Evershed, R.P., Possnert, G., Pääbo, S. (1998). Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science.* 281: 402-406.

- Poinar, H.N., Stankiewicz, B.A. (1999). Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 8426-8431.
- Poinar, H.N., Kuch, M., Sobolik, K.D., Barnes, I., Stankiewicz, A.B., Kuder, T., Spaulding, W.G., Bryant, V.M., Cooper, A., Pääbo, S. (2001). A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 4317-4322.
- Prince, A.M., Andrus, L. (1992). PCR: how to kill unwanted DNA. *BioTechniques*. 12: 358-360.
- Pusch, C.M., Scholz, M. (1997). DNA extraction from ancient human bones via enzymatic treatment. *Trends Genet.* 13: 417 (Electronic-Database Information, Elsevier Trends Journals Technical Tips Online)
- Pusch, C.M., Nicholson, G.J., Bachmann, L., Scholz, M. (2000). Degenerate Oligonucleotide-Primed Preamplification of Ancient DNA Allows the Retrieval of Authentic DNA Sequences. *Analytical Biochemistry* 279: 118-122.
- Rando, J.C. (1998). Composición genética y posible origen de las poblaciones humanas canarias deducidos del polimorfismo de su ADN mitocondrial. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, Tenerife.
- Rando, J.C., Pinto, F., González, A.M., Hernández, M., Larruga, J.M., Cabrera, V.M., Bandelt, H.-J. (1998). Mitochondrial DNA analysis of Northwest African populations reveals genetic exchanges with European, Near Eastern, and sub-Saharan populations. *Ann. Hum. Genet.* 62: 531-550.
- Rando, J.C., Cabrera, V.M., Larruga, J.M., Hernández, M., González, A.M., Pinto, F., Bandelt, H.-J. (1999). Phylogeographic patterns of mtDNA reflecting the colonization of the Canary Islands. *Ann. Hum. Genet.* 63: 413-428.
- Raoult, D., Aboudharam, G., Crubézy, E., Larrouy, G., Ludes, B., Drancourt, M. (2000). Molecular identification by "suicide PCR" of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 12800-12803.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995). An exact test of population differentiation. *Evolution*. 49: 1280-1283.
- Ribeiro-dos-Santos, A.K.C., Santos, S.E.B., Machado, A.L., Guapindaia, V., Zago, M.A. (1996). Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in pre-Columbian natives of the Amazon area. *Am. J. Phys. Anthropol.* 101: 29-37.

- Richards, M.B., Sykes, B.C., Hedges, R.E.M. (1995). Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains. *J. Arch. Sci.* 22: 291-299.
- Richards, M.B., Macaulay, V.A., Bandelt, H.-J., Sykes, B.C. (1998). Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann. Hum. Genet.* 62: 243-262.
- Richards, M., Macaulay, V., Hickey, E., Vega, E., Sykes, B., Guida, V., Rengo, C., Sellitto, D., Cruciani, F., Kivisild, T., Villems, R., Thomas, M., Rychkov, S., Rychkov, O., Rychkov, Y., Golge, M., Dimitrov, D., Hill, E., Bradley, D., Romano, V., Cali, F., Vona, G., Demaine, A., Papiha, S., Triantaphyllidis, C., Stefanescu, G. (2000). Tracing european founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1251-1276.
- Roberts, D.F., Evans, M., Ikin, E.W., Mourant, A.E. (1966). Blood groups and the affinities of the Canary Islanders. *Man.* 1: 512-525.
- Rössig, I.S. (1967). AB0-blutgruppen und Rh-Faktoren auf Teneriffa unter besonderer Berücksichtigung des Vergleichs zwischen vorspanischer und heutiger Bevölkerung. *Homo.* 18: 96-104.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230: 1850-1854.
- Salas, A., Comas, D., Lareu, M., Bertranpetit, J., Carracedo, A. (1998). MtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *Eur. J. Hum. Genet.* 6: 365-375.
- Salo, W.L., Aufderheide, A.C., Buikstra, J., Holcomb, T.A. (1994). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 2091-2094.
- Sanz de Magallanes, J.M. (2001). *In Memoriam. Enterramientos en la Parroquia Matriz de La Concepción, V Centenario (1499-1999) de la Parroquia de la Concepción de Santa Cruz de Tenerife.* Prólogo de L. Cola Benítez. Santa Cruz de Tenerife.
- Sarkar, G., Sommer, S.S. (1990) Shedding light on PCR contamination. *Nature.* 343: 27.
- Schmitz, R.W., Serre, D., Bonani, G., Feine, S., Hillgruber, F., Krainitzki, H., Pääbo, S., Smith, F.H. (2002). The Neandertal type site revisited: Interdisciplinary

- investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 13342-13347.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. (2000). Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Scholz M., Pusch, C.M. (1997). An efficient method for high quality DNA from ancient bones. *Trends Genet.* 13: 249 (Electronic-Database Information, Elsevier Trends Journals Technical Tips Online).
- Schultes, T., Hummel, S., Herrmann, B. (1999). Amplification of Y-chromosomal STRs from ancient skeletal remains. *Hum. Genet.* 104: 164-166.
- Schwarzfischer, F., Liebrich, K. (1963). Serologische untersuchungen an prähistorische Bevölkerungen insbesondere an altkanarischen Mumien. *Homo*. 7: 142-152.
- Schwidetzky, I. (1963). *La población prehispánica de las Islas Canarias*. Santa Cruz de Tenerife, Publicaciones del Museo Arqueológico.
- Sidow, A., Wilson, A.C., Pääbo, S. (1991). Bacterial DNA in *Clarkia* fossils. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 333: 429-433.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E., Smiley, C.J. (1992). An *rbcL* sequence from a Miocene *Taxodium* (bald cypress). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 449-451.
- Sorenson, M.D., Cooper, A., Paxinos, E.E., Quinn, T.W., James, H.F., Olson, S.L., Fleischer, R.C. (1999). Relationships of the extinct moa-nalos, flightless Hawaiian waterfowl, based on ancient DNA. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 266: 2187-2193.
- Springer, R. (2001). Origen y uso de la escritura líbico-bereber en Canarias. Centro de la Cultura Popular, Sta. Cruz de Tenerife.
- Stone, A.C., Stoneking, M. (1993). Ancient DNA from a Pre-Columbian amerindian population. *Am. J. Phys. Anthropol.* 92: 463-471.
- Stone, A.C., Milner, G.R., Pääbo, S., Stoneking, M. (1996). Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.* 99: 231-238.
- 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: 1153-1170.
- Suárez, J.J., Rodríguez, F., Quintero, C.L. (1988). *Historia Popular de Canarias. Vol. 2. Conquista y Colonización*. Ed. Centro de la Cultura Popular Canaria.

- Sullivan, K.M., Mannuci, A., Kimpton, C.P., Gill, P. (1993). A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques*. 15: 636-641.
- Tejera, A. (1992). *La prehistoria de Canarias*. 1. *Tenerife y los Guanches*. Santa Cruz de Tenerife: Centro de la Cultura Popular Canaria.
- Thomas, M.G., Weale, M.E., Jones, A.L., Richards, M., Smith, A., Redhead, N., Torroni, A., Scozzari, R., Gratrix, F., Tarekegn, A., Wilson, J.F., Capelli, C., Bradman, N., Goldstein, D. (2002). Founding Mothers of Jewish Communities: Geographically separated Jewish groups were independently founded by very few female ancestors. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 1411-1420.
- Thomson, R., Pritchard, J.K., Shen, P.D., Oefner, P.J., Feldman, M.W. (2000). Recent common ancestry of human Y chromosomes: evidence from DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 7360-7365.
- Torroni, A., Lott, M.T., Cabell, M.F., Chen, Y.-S., Lavergne, L., Wallace, D.C. (1994a). MtDNA and the origin of caucasians: identification of ancient caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 760-776.
- Torroni, A., Miller, J.A., Moore, L.G., Zamudio, S., Zhuang, J., Droma, T., Wallace, D.C. (1994b). Mitochondrial DNA analysis in Tibet: implications for the origin of the Tibetan population and its adaptation to high altitude. *Am. J. Phys. Anthropol.* 93: 189-199.
- Torroni, A., Neel, J.V., Barrantes, R., Schurr, T.G., Wallace, D.C. (1994c). Mitochondrial DNA "clock" for the amerinds and its implications for timing their entry into North America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 1158-1162.
- Torroni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinu, D., Savontaus, M-L., Wallace, D.C. (1996). Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*. 144:1835-1850.
- Torroni, A., Cruciani, F., Rengo, C., Sellitto, D., López-Bigas, N., Rabionet, R., Govea, N., López de Munain, A., Sarduy, M., Romero, L., Villamar, M., del Castillo, I., Moreno, F., Estivill, X., Scozzari, R. (1999). The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1349-1358.

- Torrioni, A., Bandelt, H.-J., Macaulay, V., Richards, M., Cruciani, F., Rengo, C., Martínez-Cabrera, V., Villems, R., Kivisild, T., Metspalu, E., Parik, J., Tolk, H.-V., Tambets, K., Forster, P., Karger, B., Francalacci, P., Rudan, P., Janicijevic, B., Rickards, O., Savontaus, M.-L., Huoponen, K., Laitinen, V., Koivumäki, S., Sykes, B., Hickey, E., Novelletto, A., Moral, P., Sellitto, D., Coppa, A., Al-Zaheri, N., Santachiara-Benerecetti, A.S., Semino, O., Scozzari, R. (2001). A signal, from human mtDNA, of postglacial recolonization in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 844-852.
- Underhill, P.A., Passarino, G., Lin, A.A., Shen, P., Mirazon Lahr, M., Foley, R.A., Oefner, P.J., Cavalli-Sforza, L.L. (2001). The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origin of modern human populations. *Ann. Hum. Genet.* 65: 43-62.
- Verneau, R. (1887). Rapport d'une mission scientifique dans l'Archipel Canarien. *Archives des Missions Sc. et Litté.* 3^{er} sér. XVIII: 567-817.
- Vigilant, L., Pennington, R., Harpending, H., Kocher, T.D., Wilson A.C. (1989). Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 9350-9354.
- Vigilant, L., Wilson, A.C., Harpending, H. (1991). African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science.* 253: 1503-1507.
- Walden, K.K.O., Robertson, H.M. (1997). Ancient DNA from amber fossil bees? *Mol. Biol. Evol.* 14: 1075-1077.
- Watanobe, T., Ishiguro, N., Okumura, N., Nakano, M., Matsui, A., Hongo, H., Ushiro, H. (2001). Ancient mitochondrial DNA reveals the origin of *Sus scrofa* from Rebun Island, Japan. *J. Mol. Evol.* 52: 281-289.
- Watson, E., Forster, P., Richards, M., Bandelt, H.-J. (1997). Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 691-704.
- Witas, H.W. (2001). Molecular anthropology: touching the past through ancient DNA retrieval. Methodological aspects. *Prz. Antropol.-Anthropol. Rev.* 64: 41-56.
- Woodward, S.R., King, M.J., Chiu, N.M., Kuchar, M.J., Griggs, C.W. (1994a). Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR Methods and Applications.* 3: 244-247.
- Woodward, S.R., Weyand, N.J., Bunnell, M. (1994b). DNA sequence from cretaceous period bone fragments. *Science.* 266: 1229-1232.

- Yamada, Y., Ohira, H., Iwase, H., Takatori, T., Nagao, M., Ohtani, S. (1997). Sequencing mitochondrial DNA from a tooth and application to forensic odontology. *The Journal of Forensic Odonto-Stomatology*. 15: 13-16.
- Yang, D.Y., Eng, B., Wayne, J.S., Dudar, J.C., Saunders, S.R. (1998). Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am. J. Phys. Anthropol.* 105: 539-543.
- Young, D.L., Huyen, Y., Allard, M.W. (1995). Testing the validity of the cytochrome *b* sequence from Cretaceous period bone fragments as dinosaur DNA. *Cladistics*. 11: 199-209.
- Zierdt, H., Hummel, S., Herrmann, B. (1996). Amplification of human short tandem repeats from Medieval teeth and bone samples. *Human Biology*. 68: 185-199.
- Zink, A., Reischl, U., Wolf, H., Nerlich, A.G. (2000). Molecular evidence of bacteremia by gastrointestinal pathogenic bacteria in an infant mummy from ancient Egypt. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124: 1614-1618.
- Zink, A., Reischl, U., Wolf, H., Nerlich, A.G., Miller, R. (2001). *Corynebacterium* in Ancient Egypt. *Medical History*. 45: 267-272.
- Zischler, H., Höss, M., Handt, O., von Haessler, A., van der Kuyl, A.C., Goudsmit, J., Pääbo, S. (1995). Detecting dinosaur DNA. *Science*. 268: 1192-1193.

VII. APENDICES

Apéndice1. Relación de dientes secuenciados, organizados por fosas, y la secuencia obtenida en cada fragmento. Se muestra también los polimorfismo de restricción analizados para cada diente. Las variantes se señalan por su posición menos 16.000 (Anderson y col.,1981). En cursiva se muestran las mutaciones no detectadas, pero que filogenéticamente deben estar presentes. En color azul y fucsia, los individuos determinados como machos y hembras, respectivamente.

FOSA/DIENTE	FRAGMENTO							RFLP ¹
	1	2	3	4	5	6	7	
129								
F4 (CON-226)					CRS			
F15 (CON-238)		CRS			CRS			
F18 (CON-232)			CRS		CRS		CRS	7025a (+)
F19 (CON-239)			126?		CRS		CRS	4216n (+)
F23 (CON-227)	CRS	CRS	129	CRS	CRS		CRS	
F25 (CON-230)	CRS	CRS	CRS	183C 189 223	CRS	278	CRS	
F27 (CON-231)		CRS			CRS			
F29 (CON-228)		092	CRS	172 219	278			12308h (+)
F39 (CON-234)	CRS	CRS	129	189 223	231 274 278	311	CRS	3592p (+)
F55	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F70 (hemimand)}	CRS	CRS	124	223	CRS	278 311	362	3592p (-)
F92 (hemimand)}	CRS	CRS	124?		CRS	278 311		
F74		CRS		CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F90	CRS		CRS		CRS	CRS		
F101	CRS	092	CRS	163 172 219	CRS	311	CRS	12308h (+)
F105	CRS	CRS		CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
184								
F9 (CON-206)	CRS	CRS	CRS		CRS			
F11 (CON-204)		CRS	CRS		CRS			12308h (+)
F14 (CON-208)	CRS	CRS	CRS	183C 189	CRS	CRS		
F16 (CON-200)}			CRS					
F24 (CON-211)}	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS	311		

FRAGMENTO								
FOSA/DIENTE	1	2	3	4	5	6	7	RFLP ¹
F26 (CON-202)		CRS	CRS	163 172 219	CRS		CRS	
F28 (CON-201)		CRS			CRS			
F49 (CON-207)	CRS	CRS	CRS	192	270	294 334	CRS	
223								
F10 (CON-56)		CRS	145		CRS			
F34 (CON-53)		CRS	CRS	CRS		316		7025a (-)
F38 (CON-63)	CRS	CRS	CRS		CRS			7025a (+)
F40 (CON-60)		CRS		CRS		CRS		
227								
F22 (CON-20)	CRS		CRS		CRS			
F44 (CON-14)	CRS	CRS	129	192	256 270	CRS		
F45 (CON-17)	CRS	CRS	CRS		273	311		
142								
F37 (CON-223)	CRS	CRS			CRS			
157								
F52	CRS	CRS	124	166 223	CRS	309	CRS	3592p (-)
F57	CRS	CRS	124	223	278	CRS	362	
F113		CRS	124	223	278	CRS		3592p (-)
F114		CRS	124	223	278	CRS	362?	3592p (-)
F66	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS			
F119	CRS	CRS		213 223			390	3592p (+)
161								
F56	CRS	CRS	129	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F69	CRS	CRS	CRS	189	CRS	CRS	CRS	7025a (-)

FRAGMENTO

FOSA/DIENTE	1	2	3	4	5	6	7	RFLP ¹
F73 } F77 }	CRS	CRS CRS	CRS	CRS	CRS CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F87	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS		7025a (-)
F89	CRS	069	126	CRS	CRS	318C	CRS	4216n (+)
F103	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	311	357	7025a (-)
F104	CRS	069	126	CRS	CRS	CRS	CRS	4216n (+)
F131			CRS		CRS	CRS		7025a (-)
169								
F58	CRS	CRS	CRS	223	278	CRS	390	
F65	CRS	CRS	CRS	185 223	CRS	311 327	CRS	
F76	CRS	CRS	CRS	189	270	CRS	362	
F82	CRS	CRS	CRS			CRS	CRS	7025a (-)
168								
F59	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	
F71	CRS	CRS			CRS	CRS		7025a (+)
F79		CRS	114A					
255								
F60	CRS	CRS	CRS	183C 189	CRS	CRS	CRS	7025a (+)
F81		CRS	126			CRS	CRS	
F112	CRS	CRS	126	CRS		292 294	CRS	4216n (+)
F122		CRS			CRS		CRS	
F146 } F193 }	CRS	CRS	CRS	CRS		311		7025a (+)
	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	311		7025a (+)
F165	CRS	CRS	CRS	223	223	298 325 327	CRS	
F180				CRS				7025a (+)

FRAGMENTO

FOSA/DIENTE	1	2	3	4	5	6	7	RFLP¹
154								
F62	CRS	CRS	CRS	189	CRS		390	
F75	CRS	CRS		CRS	CRS	294 296 304	CRS	
F78	CRS	069	126	CRS	CRS	CRS	CRS	4216n (+)
283								
F63	CRS	CRS		187 189 223	251	294 311		
F88	CRS	CRS	CRS		CRS	311		
F99	CRS	CRS	129	187 189 223	278	286A 292 294 311	360	3592p (+)
F107		CRS	129	187 189 223	278	286A 292 294 311	360	3592p (+)
F137		CRS	129	187 189 223		286A 292 294 311	360	3592p (+)
F102	CRS	CRS	129	187 189	265C 278	286A 292 294 311	360	3592p (+)
F132		CRS	129					3592p (+)
143								
F64	CRS	CRS		CRS	CRS			
F97	CRS	CRS	CRS	CRS		CRS		
F108		CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F80	CRS	CRS	CRS	189	270	CRS	CRS	
F83	CRS	CRS	126	CRS	CRS	292 294	CRS	
F106	CRS	CRS		CRS	CRS	298 335	CRS	7025a (+)
F109	017	CRS	129	163 187 189 223	278	293 294 301 311	360	3592p (+)
F129		CRS	CRS		CRS		362	7025a (-)
F134	CRS	CRS	126	187 188A 189 223		311	CRS	3592p (+)
F138	CRS	CRS	CRS	223	278	311	362	
153								
F67	CRS	CRS	126	CRS	CRS	294 296 304	CRS	

FRAGMENTO									
FOSA/DIENTE	1	2	3	4	5	6	7	RFLP ¹	
F72	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS		
209									
F94	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)	
F100	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	362	7025a (-)
240									
F110	CRS	CRS	093	189 223	278	CRS	CRS	CRS	7025a (+)
F117	CRS		CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F118	CRS		126	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	4216n (+)
F120 } F190 }	CRS		CRS	168	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F182	CRS	CRS	126	153		292 294		CRS	4216n (+)
F185	CRS	CRS	CRS	172 219	278	CRS	CRS	CRS	12308h (+)
F198 } F202 }	CRS	CRS	CRS	168	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
	CRS	CRS	CRS	168	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
213/214									
F111	CRS	093	093	224	CRS	311	CRS		
F156			126	163	261				4216n (+)
F184		CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
219/220									
F115	CRS	069	126	CRS	CRS	CRS	CRS		
F124	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	290	CRS	CRS	7025a (-)
F125	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (+)
F126 } F130 }	CRS	CRS		CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F127		CRS	CRS		CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (-)

FRAGMENTO								
FOSA/DIENTE	1	2	3	4	5	6	7	RFLP ¹
F128	CRS	CRS	115	187A 194	CRS	311	CRS	
F133	CRS	069	126 153	153	CRS	285T 290	CRS	4216n (+)
F136	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	
OSARIO								
F116	CRS	069	126	CRS	CRS	311	CRS	4216n (+)
159								
F123	CRS	CRS		223	CRS		391	
OSARIO II								
F139	CRS	CRS	CRS	CRS		311		7025a (+)
F158		069		CRS	CRS			4216n (+)
F167	CRS		CRS	223	CRS	CRS		
F173	CRS	069	126	CRS	CRS	311		
F187	CRS	CRS		223	CRS	311	CRS	
F189 } F191 }	CRS	CRS	CRS	CRS		CRS	CRS	
	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	7025a (+)
244								
F140	CRS	CRS	129	213	278	CRS	390	3592p (+)
F145	CRS	CRS		CRS	CRS	311	CRS	7025a (-)
F161		CRS	CRS					12308h (+)
258								
F141	CRS	CRS	CRS	189	CRS	CRS		7025a (-)
F143	CRS	CRS		223		292 295	CRS	
F148	CRS	CRS	CRS	168	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F150			CRS	CRS	CRS	CRS		7025a (+)

FRAGMENTO									
FOSA/DIENTE	1	2	3	4	5	6	7	RFLP ¹	
F157			CRS	186	CRS				
F168	CRS	CRS		CRS	248	CRS			
F177		CRS							7025a (-)
F195	CRS	093	126	187 189 223	264 270 278	293 311			
282									
F142	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS	311	CRS		12308h (+)
F147	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS	311	CRS		12308h (+)
F154		CRS		163 172 219					12308h (+)
F162	CRS	CRS	CRS	223	CRS	292	362		
F164	CRS	CRS	CRS	223	223	292	CRS		
F178	CRS	CRS	CRS	223	CRS	292	CRS		
F171	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS	311			12308h (+)
F176		CRS	CRS		CRS		CRS		7025a (-)
F181	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	311	CRS		7025a (+)
F183	CRS	093	CRS	189 223	274 278	278	356		12308h (-)
F188		CRS		CRS	CRS	CRS			7025a (-)
F192	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS	311			12308h (+)
F194	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS		7025a (-)
F197	CRS	CRS	CRS	223	223	CRS	CRS		
F200	CRS	093	CRS	CRS	263	311	CRS		7025a (-)
F201	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS	311	CRS		12308h (+)
F206	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS	311	CRS		12308h (+)
261									
F144	CRS	CRS	CRS	183C 189 223	CRS	290 319	362		
F153				CRS					
F169	CRS	CRS	126		CRS	CRS			7025a (-)

FOSA/DIENTE	FRAGMENTO							RFLP ¹
	1	2	3	4	5	6	7	
F205		CRS						
269								
F151		CRS						7025a (+)
F160	CRS	CRS	CRS	223	223 278	278 294 309	390	3592p (+)
F163	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	304 311	CRS	7025a (-)
F175		CRS	CRS			CRS		
F186	CRS	CRS	CRS	153	CRS	CRS	CRS	7025a (-)
F196		093	CRS	CRS	CRS	311	CRS	
232								
F159		CRS	CRS	163 172 219	CRS			12308h (+)
F166	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS	311	CRS	
F170	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS	311	CRS	
F174	CRS	CRS	126	CRS	CRS	286 295 296 311		
Corte 24/28								
F53			CRS		CRS		CRS	7025a (-)
Corte 28/44								
F68		CRS	CRS	CRS	CRS		CRS	7025a (+)
F85		CRS	CRS	CRS	CRS	292		7025a (-)
San Blas								
SB1	CRS	CRS	129	CRS	CRS		CRS	7025a (+)
SB2		CRS	CRS	CRS	260	CRS	CRS	7025a (-)
SB3		CRS	CRS	223	223	311	CRS	
SB5		CRS	CRS	CRS	CRS	CRS		

¹Abreviaturas: a=*AluI*; h=*HinfI*; n=*NlaIII*; p=*HpaI*.

Apéndice2. Relación de dientes aborígenes secuenciados, organizados por islas, y la secuencia obtenida en cada fragmento. Se muestran además, los polimorfismos de restricción analizados para cada diente. Las variantes se señalan por su posición menos 16.000 (Anderson y col.,1981). En cursiva se muestran las mutaciones no detectadas, pero que filogenéticamente deben estar presentes.

DIENTE / ISLA	FRAGMENTO							RFLP ¹
	1	2	3	4	5	6	7	
TENERIFE								
A2	051		CRS	223	CRS	294	CRS	
A4				175 223				
A6	CRS	CRS	CRS	163 172 219	CRS			
A18	CRS	069		CRS		CRS	CRS	
A19	CRS			CRS		298	CRS	7025a (+)
A20	CRS				CRS	CRS	CRS	
A22		CRS						12308h (+)
A23		CRS					CRS	12308h (+)
A24		CRS	CRS	CRS		291	CRS	
A26							CRS	
A27			126			292 294		
A29		CRS						7025a (+)
A30					CRS	292		
A31	CRS	CRS	126	CRS	CRS	292 294	399	4216n (+)
A32	CRS				CRS	CRS		7025a (+)
A35		CRS						
A36	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS	
A37		CRS	CRS	CRS	CRS	311		
A38		CRS	126	CRS	CRS	292 294		4216n (+)
A39		CRS		CRS				
A40		CRS		163 172 219	CRS	311		
A41	CRS	CRS		CRS				7025a (+)

DIENTE / ISLA	FRAGMENTO							RFLP ¹
	1	2	3	4	5	6	7	
G4				223			311	
G5	CRS		CRS	CRS	CRS		298	
G6		CRS					298	
G7				CRS			311	
G8			CRS				CRS	
G9	CRS	CRS		CRS	CRS		CRS	
G10	CRS	CRS		189			CRS	
G11		CRS		163 172 219			311	
G12		CRS	CRS	CRS			311	
G13		CRS	CRS	224			311	
G14		CRS	CRS	189 223			CRS	
G15		CRS	CRS	CRS			CRS	
G16		CRS					297 311	
G17		CRS	CRS	224			325	
G18		CRS	CRS	224			311	
G19	CRS	CRS	CRS	224			311	7025a (+)
G20		CRS	CRS	189	CRS		CRS	12308h (+)
G21	CRS	CRS	CRS	172			CRS	
G23	CRS		CRS	189			CRS	
G24		CRS	CRS				302	
G25		067	CRS	CRS			CRS	7025a (-)
A10	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS		311	7025a (+)
HIERRO								
H1	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS		309 318T	CRS
H2	CRS	CRS	CRS	CRS	CRS		311	7025a (-)
H3		CRS	CRS	CRS	CRS			7025a (+)
H4			126		CRS			4216n (+)

DIENTE / ISLA	FRAGMENTO							RFLP ¹
	1	2	3	4	5	6	7	
H5			129					7025a (+)
H6	CRS	CRS	CRS		CRS	CRS	CRS	
H7	CRS	CRS	093		CRS	CRS	CRS	
H8		CRS			CRS	292		
H9		CRS			CRS	CRS		

¹Abreviaturas: a=*AluI*; h=*HinfI*; n=*NlaIII*.