

Resultados

RESULTADOS

1. EXTRACCIONES

Las extracciones se realizaron de acuerdo con el protocolo ya descrito en el apartado 7 del capítulo “Métodos” en grupos formados por 7 muestras más un blanco de extracción. De esta manera se procesaron un total de 139 muestras y 23 blancos en 21 grupos de extracción. La muestra TR15 fue extraída dos veces a partir de dos alícuotas del mismo polvo de hueso por motivos de contaminación. La **Tabla R1** resume las cantidades de polvo de hueso obtenidas tras la trituración de las muestras así como los volúmenes de los extractos resultantes.

Tabla R1. Extracciones de las muestras analizadas en la presente tesis doctoral. Cuando fue posible parte del polvo obtenido tras la trituración de la pieza ósea o dental fue procesado y el remanente guardado para otras aplicaciones. De la misma manera, el volumen de extracto de DNA obtenido fue redistribuido en dos alícuotas, a partir de una de las cuales se intentó la amplificación de un segmento de la región control del mtDNA.

Grupo extracción	Yacimiento	Muestra	Peso del polvo de hueso (g)			Volumen de los extractos (µl)		
			Total	Procesado	Reserva	Total	Procesado	Reserva
1	Tell Halula	TH1	2.59	1.34	1.27	750	375	375
1	Tell Halula	TH3	1.23	0.67	0.54	1500	750	750
1	Tell Halula	TH6	1.55	0.93	0.62	800	400	400
1	Tell Halula	TH8	1.15	0.87	0.29	1000	500	500
1	Tell Ramad	TR1	1.36	0.74	0.57	400	200	200
1	Tell Ramad	TR2	1.29	0.68	0.57	350	175	175
1	Tell Ramad	TR3	1.33	0.70	0.57	580	290	290
1	Tell Ramad	TR5	0.51	0.51	0	450	225	225
1	Control extracción	CE1	-	-	-	325	162.5	162.5
2	Tell Ramad	TR8	1.15	0.72	0.43	470	250	220
2	Tell Ramad	TR10	0.63	0.63	0	70	40	30
2	Tell Ramad	TR13	0.56	0.56	0	310	160	150
2	Tell Ramad	TR15-1	0.91	0.70	0.18	125	65	60
2	Control extracción	CE2	-	-	-	620	310	310
3	Tell Ramad	TR15-2	0.18	0.18	0	170	90	80
3	Control extracción	CE3	-	-	-	190	100	90
3	Control extracción	CE4	-	-	-	190	100	90
3	Control extracción	CE5	-	-	-	90	60	30
4	Nerja	1NE	0.91	0.77	0.13	275	150	125
4	Nerja	2NE	1.54	0.77	0.77	340	170	170
4	Nerja	3NE	1.88	0.73	1.14	340	200	140
4	Nerja	4NE	1.04	0.74	0.30	240	140	100
4	Nerja	5NE	1.95	0.79	1.12	145	75	70
4	El Pirulejo	1P1	0.34	0.34	0	80	50	30
4	El Pirulejo	2P2	0.77	0.77	0	100	50	50
4	Control extracción	CE6	-	-	-	150	75	75
5	Tell Halula	TH2	1.24	0.61	0.63	125	75	50
5	Tell Halula	TH4	1.27	0.69	0.68	200	100	100
5	Tell Halula	TH5	0.44	0.44	0	280	150	130
5	Tell Halula	TH7	0.64	0.64	0	50	25	25
5	Tell Ramad	TR7	1.88	0.63	1.25	1200	600	600

Tabla R1. (Continuación).

Grupo extracción	Yacimiento	Muestra	Peso del polvo de hueso (g)			Volumen de los extractos (μl)		
			Total	Procesado	Reserva	Total	Procesado	Reserva
5	Tell Ramad	TR9	1.31	0.61	0.69	610	310	300
5	Tell Ramad	TR11	1.00	0.61	0.38	1300	700	600
5	Control extracción	CE7	-	-	-	1100	600	500
6	Tell Ramad	TR4	0.51	0.51	0	200	100	100
6	Tell Ramad	TR6	0.69	0.69	0	500	250	250
6	Tell Ramad	TR12	0.89	0.70	0.19	190	100	90
6	Tell Ramad	TR19	1.05	0.59	0.45	525	275	250
6	Tell Ramad	TR14	1.66	0.67	0.98	120	70	50
6	Tell Ramad	TR16	1.25	0.65	0.60	165	100	65
6	Tell Ramad	TR18	1.16	0.58	0.56	365	200	165
6	Control extracción	CE8	-	-	-	250	150	100
7	Amir Abdallah	AA1	0.98	0.58	0.40	145	75	70
7	Amir Abdallah	AA2	0.82	0.62	0.19	100	50	50
7	Amir Abdallah	AA3	0.29	0.29	0	195	100	95
7	Amir Abdallah	AA4	0.43	0.43	0	155	100	55
7	Amir Abdallah	AA5	0.42	0.42	0	460	250	210
7	Amir Abdallah	AA6	0.93	0.67	0.26	210	110	100
7	Amir Abdallah	AA7	0.56	0.56	0	520	270	250
7	Amir Abdallah	AA8	0.68	0.68	0	525	275	250
7	Amir Abdallah	AA9	0.20	0.20	0	450	225	225
7	Amir Abdallah	AA11	0.28	0.28	0	200	100	100
7	Amir Abdallah	AA12	0.53	0.53	0	300	150	150
7	Control extracción	CE9	-	-	-	375	200	175
8	Toledo	TO1	0.57	0.57	0	900	450	450
8	Caldeirão	CA7	0.87	0.62	0.26	950	500	450
8	Control extracción	CE11	-	-	-	600	300	300
8	Abauntz	1AB8	0.32	0.32	0	400	200	200
8	Abauntz	AB9	2.74	0.68	2.03	350	175	175
8	Abauntz	AB13	1.72	0.64	1.08	450	225	225
9	Abauntz	AB14	2.07	0.66	1.40	410	205	205
9	Abauntz	AB15	1.37	0.60	0.77	970	485	485
9	Abauntz	AB17	1.60	0.69	0.93	800	400	400
9	Abauntz	AB11	1.83	0.64	1.18	650	325	325
9	Control extracción	CE12	-	-	-	325	162	163
10	Abauntz	AB20	0.90	0.61	0.30	615	307	308
10	Tres Montes	2TM1	0.51	0.51	0	440	220	220
10	Tres Montes	1TM2	0.96	0.65	0.32	855	427	428
10	Tres Montes	1TM4	0.51	0.51	0	300	150	150
10	Tres Montes	1TM5	0.75	0.62	0.14	680	340	340
10	Tres Montes	1TM6	0.81	0.65	0.19	1140	570	570
10	Tres Montes	TM11	0.62	0.62	0	610	305	305
10	Control extracción	CE13	-	-	-	660	330	330
11	Tell Halula	1H9	0.44	0.44	0	210	110	100
11	Tell Halula	2H11	0.90	0.57	0.24	600	300	300
11	Tell Halula	2H13	1.49	0.64	0.77	710	360	350
11	Tell Halula	1H14	0.48	0.48	0	320	170	150
11	Tell Halula	1H15	1.16	0.55	0.50	690	360	330
11	Tell Halula	1H17	0.31	0.31	0	880	440	440
11	Tell Halula	1H18	0.37	0.37	0	755	380	375
11	Control extracción	CE14	-	-	-	550	300	250
12	Tell Halula	2H20	1.38	0.60	0.65	145	70	75
12	Tell Halula	1H21	0.98	0.61	0.24	330	170	160
12	Tell Halula	2H9	0.38	0.38	0	440	220	220
12	Tell Halula	2H10	0.51	0.51	0	415	215	200
12	Tell Halula	3H11	0.92	0.60	0.30	460	230	230
12	Tell Halula	H12	3.38	0.62	2.74	1150	580	570
12	Tell Halula	1H16	0.77	0.54	0.20	600	300	300
12	Control extracción	CE15	-	-	-	770	390	380
13	Sant Pau	SP2	0.91	0.47	0.45	525	275	250
13	Sant Pau	2SP6	0.11	0.11	0	120	60	60

Tabla R1. (Continuación).

Grupo extracción	Yacimiento	Muestra	Peso del polvo de hueso (g)			Volumen de los extractos (μl)		
			Total	Procesado	Reserva	Total	Procesado	Reserva
13	Sant Pau	1SP7	0.75	0.61	0.14	55	30	25
13	Sant Pau	1SP18	0.79	0.67	0.12	750	400	350
13	Sant Pau	SP19	1.99	0.62	1.35	250	150	100
13	Sant Pau	1SP6	0.21	0.21	0	500	250	250
13	Sant Pau	2SP7	2.03	0.64	1.38	700	400	300
13	Control extracción	CE16	-	-	-	600	300	300
14	Sant Pau	2SP18	1.80	0.60	1.17	440	220	220
14	Dja'de	DJ1	0.58	0.58	0	80	40	40
14	Dja'de	DJ3	0.80	0.61	0.19	600	300	300
14	Dja'de	1DJ4	0.79	0.61	0.19	140	70	70
14	Dja'de	1DJ6	0.82	0.61	0.22	380	200	180
14	Dja'de	2DJ6	0.37	0.37	0	120	60	60
14	Tres Montes	TM3	0.62	0.62	0	105	60	45
14	Control extracción	CE17	-	-	-	120	80	40
15	Muge	TA8	1.80	0.66	1.11	660	350	310
15	Muge	TA7	0.53	0.53	0	1295	650	645
15	Muge	TA9	2.15	0.61	1.49	492	246	246
15	Caldeirão	CA8	1.75	0.61	1.10	900	450	450
15	Tres Montes	2TM4	0.60	0.60	0	1520	770	750
15	Tres Montes	TM7	0.60	0.60	0	1140	590	550
15	Tres Montes	TM12	0.63	0.63	0	1180	580	600
15	Control extracción	CE18	-	-	-	145	72	73
16	Abauntz	AB3	0.68	0.68	0	880	440	440
16	Abauntz	AB5	0.79	0.64	0.16	200	100	100
16	Abauntz	AB6	0.76	0.66	0.12	940	470	470
16	Abauntz	AB21	1.03	0.70	0.34	450	225	225
16	Tres Montes	TM8	1.09	0.66	0.43	240	120	120
16	Tres Montes	TM10	0.54	0.54	0	770	385	385
16	Tres Montes	TM13	0.47	0.47	0	970	485	485
16	Control extracción	CE19	-	-	-	860	430	430
17	Mari	1MA1	0.79	0.64	0.15	700	350	350
17	Mari	2MA2	0.86	0.62	0.24	790	395	395
17	Mari	1MA3	0.35	0.35	0	500	250	250
17	Mari	1MA4	0.83	0.62	0.21	595	300	295
17	Mari	2MA4	0.49	0.49	0	385	200	185
17	Mari	1MA5	0.42	0.42	0	300	150	150
17	Mari	1MA6	0.95	0.59	0.36	200	100	100
17	Control extracción	CE20	-	-	-	265	135	130
18	Mari	1MA7	0.36	0.36	0	185	145	140
18	Mari	1MA8	1.28	0.59	0.69	365	185	180
18	Mari	2MA10	0.64	0.64	0	390	200	190
18	Mari	3MA11	0.67	0.67	0	420	220	200
18	Mari	1MA12	0.96	0.58	0.38	1030	530	500
18	Control extracción	CE21	-	-	-	400	200	200
19	Tell Halula	1H24	0.6	0.6	0	290	145	145
19	Tell Halula	1H26	0.63	0.63	0	430	215	215
19	Tell Halula	1H28	0.88	0.67	0.21	260	130	130
19	Tell Halula	2H30	0.66	0.66	0	340	170	170
19	Tell Halula	1H1	0.87	0.61	0.25	670	335	335
19	Tell Halula	1H2	1.15	0.65	0.5	850	425	425
19	Tell Halula	2H31	0.71	0.59	0.12	360	180	180
19	Tell Halula	1H32	0.36	0.36	0	450	225	225
19	Tell Halula	1H33	0.45	0.45	0	280	140	140
19	Tell Halula	2H25	0.77	0.65	0.12	240	120	120
19	Tell Halula	2H34	0.42	0	0	290	145	145
19	Control extracción	CE22	-	-	-	500	250	250
20	Tell Halula	H35	0.53	0.53	0	330	165	165

Tabla R1. (Continuación).

Grupo extracción	Yacimiento	Muestra	Peso del polvo de hueso (g)			Volumen de los extractos (μl)		
			Total	Procesado	Reserva	Total	Procesado	Reserva
20	Tell Halula	1H36	0.33	0.33	0	625	325	300
20	Tell Halula	1H37	0.18	0.18	0	540	270	270
20	Tell Halula	2H38	1.31	0.59	0.72	865	435	430
20	Tell Halula	1H39	1.05	0.63	0.42	430	215	215
20	Tell Halula	1H40	1.85	0.63	1.22	470	235	235
20	Tell Halula	2H40	1.16	0.63	0.53	260	130	130
20	Control extracción	CE23	-	-	-	665	335	330
21	Tell Halula	2H41	0.38	0.38	0	530	265	265
21	Tell Halula	H42	0.82	0.61	0.21	475	250	225
21	Tell Halula	1H43	0.61	0.61	0	650	325	325
21	Tell Halula	H44	1.49	0.6	0.89	575	300	275
21	Tell Halula	1H45	1.24	0.57	0.65	450	225	225
21	Tell Halula	1H46	0.24	0.24	0	460	230	230
21	Tell Halula	2H47	0.39	0.39	0	500	250	250
21	Control extracción	CE24	-	-	-	810	410	400

2. CONTENIDO TOTAL Y RACEMIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS

2.1. Contenido total de aminoácidos

2.1.1. Aminoácidos estimados

Se obtuvieron 105 resultados de aminoácidos en todas las muestras estudiadas según el procedimiento descrito en el apartado 2.1 del capítulo “Métodos”. Esto supone una media de 2.69 aminoácidos por muestra. Treinta y dos de estas estimas correspondían a muestras de diente total (2.13 aminoácidos/muestra), 58 a muestras de dentina (2.9 aminoácidos/muestra) y 15 procedían de muestras de hueso (3.75 aminoácidos/muestra).

En la **Tabla R2** se muestran las unidades totales de cada uno de los aminoácidos (formas D+L) para cada una de las muestras. Estas cantidades fueron estandarizadas refiriéndolas a una muestra “tipo” de 100mg de la que se inyectaron 4µl. En la **Tabla R3** se presenta el porcentaje de cada uno de los aminoácidos estimados respecto al contenido total de aminoácido de cada muestra. Como puede apreciarse en ambas tablas únicamente el ácido aspártico (Asp) pudo ser estimado en todas las muestras estudiadas.

Tabla R2. Contenido total (formas D + L) por muestra de los aminoácidos alanina (Ala), valina(Val), isoleucina (Ile), prolina (Pro), Leucina (Leu), ácido aspártico (Asp), fenilalanina (Phe) y ácido glutámico (Glu) estandarizados respecto a una muestra “tipo” de 100mg de peso de la que se han injectado 4µl.

Individuo	Muestra	Yacimiento	Tejido	Ala	Val	Iso	Pro	Leu	Asp	Phe	Glu	Ser
AB35E	AB17	Abauntz	Diente total	0	0	0	0	6241148	12657213	3011311	16484098	0
AB17C	AB14	Abauntz	Diente total	131576066	0	0	0	28261828	50909474	13230914	84380055	0
AB23C	AB9	Abauntz	Diente total	24555520	86526080	330240	0	3670720	8744320	1826240	13648640	0
O10 107	CA7	Caldeirao	Diente total	61879385	3531385	1281231	0	10929538	17994462	4701538	35476923	0
SK-R 3	3DJ6	Dja'de	Hueso	679632	176658	88184	0	354658	703684	155789	1201921	0
1	IMA1	Mari	Diente total	20467511	1666498	652152	0	4246076	6655527	2112068	10068186	0
8	IMA8	Mari	Diente total	151000148	20699041	317048	1285018	32711144	49871587	14589225	84905683	0
12	IMA12	Mari	Diente total	34054264	85989147	1459845	0	6353488	10752868	2939535	18431318	0
NE-1829	5NE	Nerja	Hueso	5440909	12492121	243939	0	989697	2580606	502727	3742727	0
NE-NM82.2	2NE	Nerja	Dentina	339881172	45132050	16308619	0	69971213	121339916	31917322	196343096	0
H25	H25	Tell Halula	Dentina	70526	22982	6895	0	45825	177667	23316	130491	0
H26	H26	Tell Halula	Dentina	159835	46557	20565	0	54617	157304	21722	276661	0
H30	H30	Tell Halula	Dentina	5542256	625496	209549	0	883782	2343865	383586	3373639	0
H35	1H1	Tell Halula	Dentina	141619	54062	5227	0	36010	129763	14361	155990	0
H35	1H1	Tell Halula	Diente total	0	0	0	0	0	665280	0	0	0
H37	1H20	Tell Halula	Dentina	86644	27447	9886	0	40265	233485	11652	258144	0
H37	2H20	Tell Halula	Diente total	68221	16391	6247	99609	30213	96936	14502	261345	0
H43	2H31	Tell Halula	Dentina	284163	70975	36100	0	155713	424475	72375	859763	0
H43	2H31	Tell Halula	Diente total	0	0	0	0	0	3088032	0	0	0
H47	2H18	Tell Halula	Dentina	763750	96350	27233	0	171183	677117	69533	843117	0
H48	1H33	Tell Halula	Dentina	2273400	5779800	174000	0	474550	1126650	263900	1705950	0
H49	2H15	Tell Halula	Dentina	0	0	0	0	0	199000	0	0	0
H52	H19	Tell Halula	Dentina	540493	116710	36043	0	21913	718783	47899	1692275	0
H53	2H14	Tell Halula	Dentina	213977	68152	16689	0	64235	354750	25394	492288	0
H54	2H34	Tell Halula	Dentina	156702	42263	19158	0	69333	127632	21351	201386	0
H57	1H21	Tell Halula	Dentina	195654	50575	18890	0	92142	303882	40346	484220	0
H57	2H21	Tell Halula	Diente total	0	0	0	0	0	1349821	0	0	0
H64	1H13	Tell Halula	Dentina	126638	25448	9286	0	63552	234448	57800	423724	0
H65	1H10	Tell Halula	Dentina	157529	82632	30897	0	106391	288011	37943	311805	0
H70	1H11	Tell Halula	Dentina	131117	28900	12333	0	122617	154933	43017	223933	0
H70	2H11	Tell Halula	Diente total	14240627	35776627	309647	0	3098980	5686588	1463529	9218510	0
R65-4II	TR9	Tell Ramad	Diente total	0	0	0	0	0	18911061	0	0	0
R65-4II	TR11	Tell Ramad	Diente total	0	0	0	0	0	8227833	0	0	0
R65-C8-SEB	TR16	Tell Ramad	Hueso	507386	131163	47795	259405	108316	555926	185079	681581	0
R65-1S	TR18	Tell Ramad	Hueso	3922248	560572	183414	6192552	767110	1597172	412097	2791669	0
TM-8	2TM5	Tres Montes	Dentina	165987	71211	11816	0	66368	957263	470750	275408	0
TM-8	1TM5	Tres Montes	Diente total	1227922	135529	0	0	241255	2292392	0	1970510	0
TM-11	2TM6	Tres Montes	Dentina	0	0	0	0	0	13151556	0	0	0
TM-11	1TM6	Tres Montes	Diente total	0	0	0	0	0	14427451	0	0	0

Tabla R3. Porcentaje de cada aminoácido respecto a la cantidad total de aminoácidos estimada por muestra.

Individuo	Muestra	Yacimiento	Telido	Ala	Val	Iso	Pro	Leu	Asp	Phe	Glu	Ser
AB35E	AB17	Abauntz	Diente total	0.00	0.00	0.00	0.00	16.26	32.97	7.84	42.93	0.00
AB17C	AB14	Abauntz	Diente total	42.67	0.00	0.00	0.00	9.17	16.51	4.29	27.36	0.00
AB23C	AB9	Abauntz	Diente total	17.63	62.11	0.24	0.00	2.64	6.28	1.31	9.80	0.00
O10 107	CA7	Caldeirao	Diente total	45.57	2.60	0.94	0.00	8.05	13.25	3.46	26.13	0.00
SK-R 3	3Dj6	Dja'de	Hueso	20.22	5.26	2.62	0.00	10.55	20.94	4.64	35.77	0.00
1	IMA1	Mari	Diente total	44.62	3.63	1.42	0.00	9.26	14.51	4.60	21.95	0.00
8	IMA8	Mari	Diente total	42.49	5.82	0.09	0.36	9.20	14.03	4.11	23.89	0.00
12	IMA12	Mari	Diente total	21.29	53.75	0.91	0.00	3.97	6.72	1.84	11.52	0.00
NE-1829	5NE	Nerja	Hueso	20.93	48.06	0.94	0.00	3.81	9.93	1.93	14.40	0.00
NE-NM82.2	2NE	Nerja	Dentina	41.40	5.50	1.99	0.00	8.52	14.78	3.89	23.92	0.00
H25	H25	Tell Halula	Dentina	14.76	4.81	1.44	0.00	9.59	37.19	4.88	27.32	0.00
H26	H26	Tell Halula	Dentina	21.68	6.31	2.79	0.00	7.41	21.34	2.95	37.53	0.00
H30	2H30	Tell Halula	Dentina	41.48	4.68	1.57	0.00	6.61	17.54	2.87	25.25	0.00
H35	1H1	Tell Halula	Dentina	26.37	10.07	0.97	0.00	6.71	24.16	2.67	29.05	0.00
H35	1H1	Tell Halula	Diente total	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
H37	1H20	Tell Halula	Dentina	12.98	4.11	1.48	0.00	6.03	34.98	1.75	38.67	0.00
H37	2H20	Tell Halula	Diente total	11.50	2.76	1.05	16.78	5.09	16.33	2.44	44.04	0.00
H43	2H31	Tell Halula	Dentina	14.93	3.73	1.90	0.00	8.18	22.30	3.80	45.17	0.00
H43	2H31	Tell Halula	Diente total	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
H47	2H18	Tell Halula	Dentina	28.84	3.64	1.03	0.00	6.46	25.57	2.63	31.84	0.00
H48	1H33	Tell Halula	Dentina	19.27	48.99	1.47	0.00	4.02	9.55	2.24	14.46	0.00
H49	2H15	Tell Halula	Dentina	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
H52	H19	Tell Halula	Dentina	17.03	3.68	1.14	0.00	0.69	22.65	1.51	53.31	0.00
H53	2H14	Tell Halula	Dentina	17.32	5.52	1.35	0.00	5.20	28.71	2.06	39.85	0.00
H54	2H34	Tell Halula	Dentina	24.57	6.63	3.00	0.00	10.87	20.01	3.35	31.57	0.00
H57	1H21	Tell Halula	Dentina	16.50	4.27	1.59	0.00	7.77	25.63	3.40	40.84	0.00
H57	2H21	Tell Halula	Diente total	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
H64	1H13	Tell Halula	Dentina	13.46	2.70	0.99	0.00	6.75	24.92	6.14	45.03	0.00
H65	1H10	Tell Halula	Dentina	15.52	8.14	3.04	0.00	10.48	28.37	3.74	30.71	0.00
H70	1H11	Tell Halula	Dentina	18.29	4.03	1.72	0.00	17.10	21.61	6.00	31.24	0.00
H70	2H11	Tell Halula	Diente total	20.40	51.26	0.44	0.00	4.44	8.15	2.10	13.21	0.00
R65-4II	TR9	Tell Ramad	Diente total	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
R65-4II	TR11	Tell Ramad	Diente total	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
R65-C8-SEB	TR16	Tell Ramad	Hueso	20.49	5.30	1.93	10.47	4.37	22.45	7.47	27.52	0.00
R65-1S	TR18	Tell Ramad	Hueso	23.88	3.41	1.12	37.70	4.67	9.72	2.51	16.99	0.00
TM-8	2TM6	Tres Montes	Dentina	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
TM-8	1TM6	Tres Montes	Diente total	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
TM-11	2TM5	Tres Montes	Dentina	8.22	3.53	0.59	0.00	3.29	47.42	23.32	13.64	0.00
TM-11	1TM5	Tres Montes	Diente total	20.93	2.31	0.00	0.00	4.11	39.07	0.00	33.58	0.00

2.2. Ratio de formas D y L

En la **Tabla R4** se muestra la ratio de racemización, expresada como cociente de formas D y formas L para cada aminoácido y muestra.

Tabla R4. Resultados de racemización expresados como ratio D/L de los aminoácidos alanina (Ala), valina (Val), isoleucina (Ile), prolina (Pro), leucina (Leu), ácido aspártico (Asp), fenilalanina (Phe) y ácido glutámico (Glu).

Individuo	Muestra	Yacimiento	Tejido	Ala	Val	Ile	Pro	Leu	Asp	Phe	Glu	Ser
AB35E	AB9	Abauntz	Diente total	0.010					0.087			
AB17C	AB14	Abauntz	Diente total						0.088		0.012	
AB23C	AB17	Abauntz	Diente total						0.155		0.016	
O10 107	CA7	Caldeirao	Diente total					0.012	0.107		0.018	
SK-R 3	3DJ6	Dja'de	Hueso						0.123		0.062	
1	1MA1	Mari	Diente total	0.019					0.134			
8	1MA8	Mari	Diente total	0.011	0.008			0.010	0.126		0.019	
12	1MA12	Mari	Diente total	0.019					0.114		0.022	
NE-1829	5NE	Nerja	Hueso	0.084					0.272		0.077	
NE-NM82.2	2NE	Nerja	Dentina	0.016	0.009	0.022		0.010	0.142	0.019	0.019	
H-25	H25	Tell Halula	Dentina						0.185		0.392	
H-26	H26	Tell Halula	Dentina						0.108		0.034	
H-30	2H30	Tell Halula	Dentina	0.001	0.011	0.015		0.016	0.224	0.026	0.054	
H-35	1H1	Tell Halula	Dentina		0.592				0.125		0.119	
H-35	1H1	Tell Halula	Diente total						0.340			
H-37	1H20	Tell Halula	Dentina						0.244		0.119	
H-37	2H20	Tell Halula	Diente total	0.226					0.376		0.273	
H-43	2H31	Tell Halula	Dentina	0.014					0.117		0.048	
H-43	2H31	Tell Halula	Diente total						0.187			
H-47	2H18	Tell Halula	Dentina						0.255		0.147	
H-48	1H33	Tell Halula	Dentina						0.154		0.030	
H-49	2H15	Tell Halula	Dentina						0.125			
H-52	H19	Tell Halula	Dentina						0.275		0.172	
H-53	2H14	Tell Halula	Dentina		0.052				0.190		0.173	
H-54	2H34	Tell Halula	Dentina						0.227		0.064	
H-57	1H21	Tell Halula	Dentina		0.168				0.203		0.131	
H-57	2H21	Tell Halula	Diente total						0.141			
H-64	1H13	Tell Halula	Dentina	0.114	0.182			0.093	0.254		0.062	
H-65	1H10	Tell Halula	Dentina					0.113	0.219		0.120	
H-70	1H11	Tell Halula	Dentina						0.171			
H-70	2H11	Tell Halula	Diente total	0.022					0.179		0.032	
R65-4II	TR9	Tell Ramad	Diente total						0.120			
R65-4II	TR11	Tell Ramad	Diente total						0.146			
R65-C8-SEB	TR16	Tell Ramad	Hueso	0.140					0.205	1.051	0.029	
R65-1S	TR18	Tell Ramad	Hueso	0.047			7.002	0.058	0.212	0.181	0.069	
TM-8	2TM6	Tres Montes	Dentina						0.122			
TM-8	1TM6	Tres Montes	Diente total						0.121			
TM-11	2TM5	Tres Montes	Dentina	0.046	0.937				0.123	0.059	0.226	
TM-11	1TM5	Tres Montes	Diente total	0.205					0.551		0.166	

2.2.1. Relación entre ratios de racemización de diferentes aminoácidos

En la **Tabla R4** puede apreciarse que existen diferencias entre las ratios de racemización de los diferentes aminoácidos que pudieron ser estimadas mediante este método. La tasa de racemización del ácido aspártico está entre las mayores del conjunto y pudo ser estimada en la totalidad de las muestras analizadas.

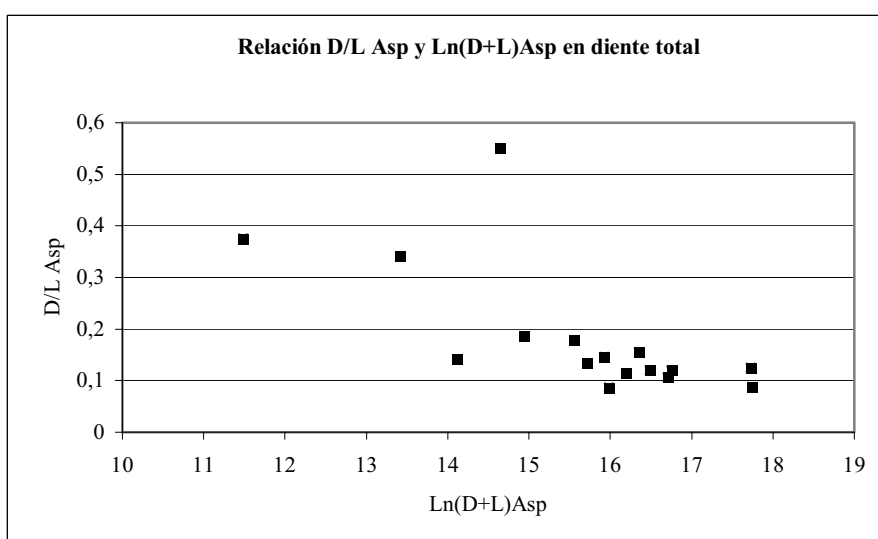
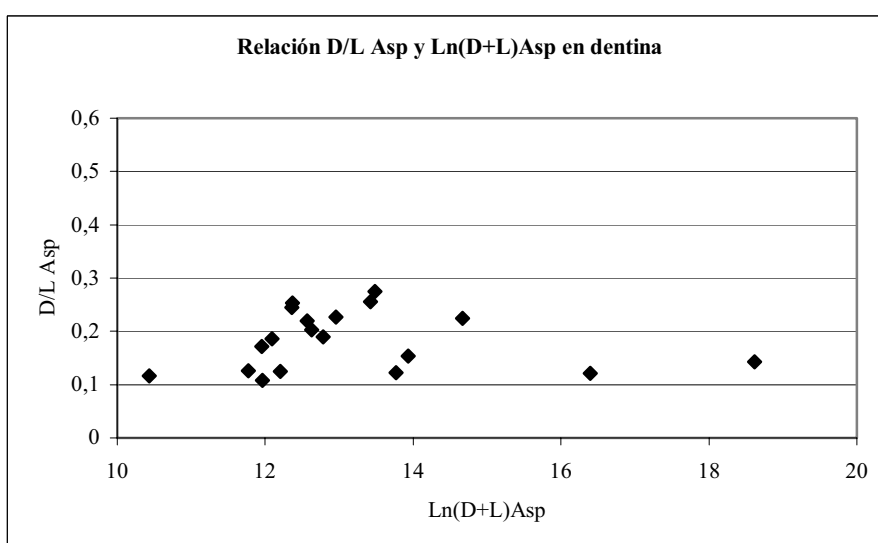
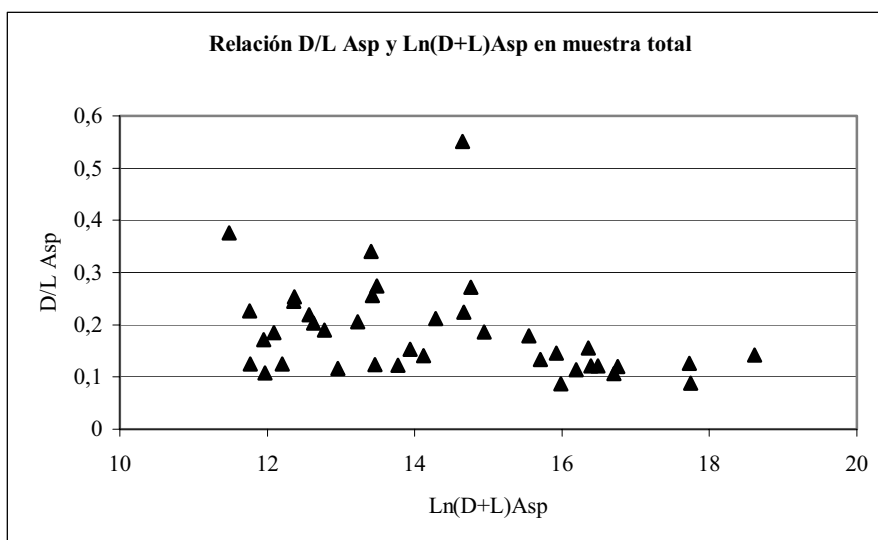
Según POINAR *et al.* 1996 la relación $D/L \text{ Asp} > D/L \text{ Ala} > D/L \text{ Leu}$ es indicativa de la ausencia de contaminación de la muestra con aminoácidos exógenos durante el proceso de deposición. Estos 3 aminoácidos pudieron estimarse conjuntamente únicamente en tres casos. En 9 de ellos junto con el ácido aspártico pudo valorarse la alanina y en tres la leucina.

En todos estos casos estudiados la ratio D/L del ácido aspártico es superior a la de los otros 2 aminoácidos y –exceptuando a TR18 y H30– se cumple la relación propuesta por Poinar y colaboradores. En ambos individuos la relación entre las isoformas D y L de la leucina es superior a la de la alanina. Estos resultados pueden ser debidos a errores en la estima del ratio entre las 2 isoformas provocado por la escasez de formas D, próximas al límite de detección del sistema. Puesto que la ratio D/L Asp sigue siendo superior a la de estos 2 aminoácidos no puede hablarse de contaminación con aminoácidos exógenos.

2.2.2. Racemización del ácido aspártico

2.2.2.1. Relación de la ratio de racemización del ácido aspártico y el contenido total en formas D y L

En los **gráficos FR1, FR2 y FR3** se representa la relación entre la ratio de racemización del ácido aspártico expresado como D/L y la suma total de ambas isoformas, expresada como Ln (D+L) en muestra total, diente y dentina.



Gráficos FR1, FR2 y FR3. Relación entre la ratio de racemización del ácido aspártico (D/L Asp) y la cantidad total de este aminoácido expresada como Ln(D+L)Asp.

Según el “Test de correlación de Pearson” (**Tabla R5**) con una significación de 0.05 no existe una asociación significativa entre las dos variables en todos los tejidos analizados (“muestra total”) y separadamente en diente y dentina, por lo que puede concluirse que la ratio de racemización del ácido aspártico obtenida en estas muestras es independiente de la cantidad total de aminoácido recuperado.

Tabla R5. Resultados del “Test de correlación de Pearson” entre la ratio de racemización del ácido aspártico (D/L ratio) y el logaritmo neperiano de la cantidad total de ácido aspártico $\ln(D+L)_{Asp}$ con un nivel de significación de 0.05.

	R	Intervalo	R²	P
Muestra total	-0.25	-0.53 a -0.06	0,06595	0.11
Dentina	-0.2	-0.6 a 0.28	0,04009	0.41
Diente total	-0.45	-0.77 a 0.06	0,2013	0.08

2.2.2.2. Diferencias en la ratio de racemización por individuo y tejido

Los valores de racemización del ácido aspártico medidos en dos muestras diferentes del mismo tejido (diente total) procedentes del mismo individuo (individuo R65-4 II, muestras TR9 y TR11) fueron muy similares.

En cuatro de los siete casos en los que la ratio D/L Aspártico fue estimado en muestras de dentina y diente total del mismo individuo se obtuvieron valores muy similares (TM6, H70, H43 y H37). En los casos restantes (TM5, H35 y H57) se obtuvieron valores muy dispares, siendo la ratio de racemización en todos los casos excepto en H57 superior en la muestra de diente total que en la de dentina.

2.2.2.3. Diferencias por antigüedad y yacimiento

Dentro de un mismo yacimiento y para un mismo tipo de tejido existe una gran variación entre las ratios de racemización tal y como muestra la **Tabla R6**. La mayor dispersión corresponde a la muestra de diente total del yacimiento de Tres Montes. En cuanto a la dentina, la mayor variación corresponde al yacimiento de Tell Halula, aunque también es éste el yacimiento en el que fue analizada la ratio D/L en un mayor número de muestras.

Tabla R6. Estadística básica de las ratios de racemización del ácido aspártico (Asp) para los diferentes yacimientos estudiados y tejidos. N: Número de muestras estudiadas; SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

Yacimiento	Edad	Tejido	N	Media D/L Asp	SD D/L Asp	D/L Asp mínimo	D/L Asp máximo	%CV (SD/media)
Abauntz	4500 A.P.	diente total	3	0.106	0.039	0.087	0.155	36.88
Tres Montes	4500 A.P.	dentina	2	0.122	0.001	0.122	0.123	0.69
Tres Montes	4500 A.P.	diente total	2	0.258	0.304	0.121	0.551	117.81
Nerja 1	18000 A.P.	dentina	1	0.142	-	-	-	-
Nerja 2	5875 A.P.	hueso	1	0.272	-	-	-	-
Tell Ramad	10000 A.P.	hueso	2	0.208	0.005	0.205	0.212	2.26
Tell Ramad	10000 A.P.	diente total	2	0.133	0.018	0.120	0.146	13.83
Mari	4500 A.P.	diente total	3	0.124	0.010	0.114	0.134	7.88
Dja'de	10000 A.P.	hueso	1	0.123	-	-	-	-
Caldeirao	6800 A.P.	diente total	1	0.107	-	-	-	-
Tell Halula	10000 A.P.	dentina	17	0.182	0.054	0.108	0.275	29.71
Tell Halula	10000 A.P.	diente total	4	0.256	0.102	0.107	0.376	40.02

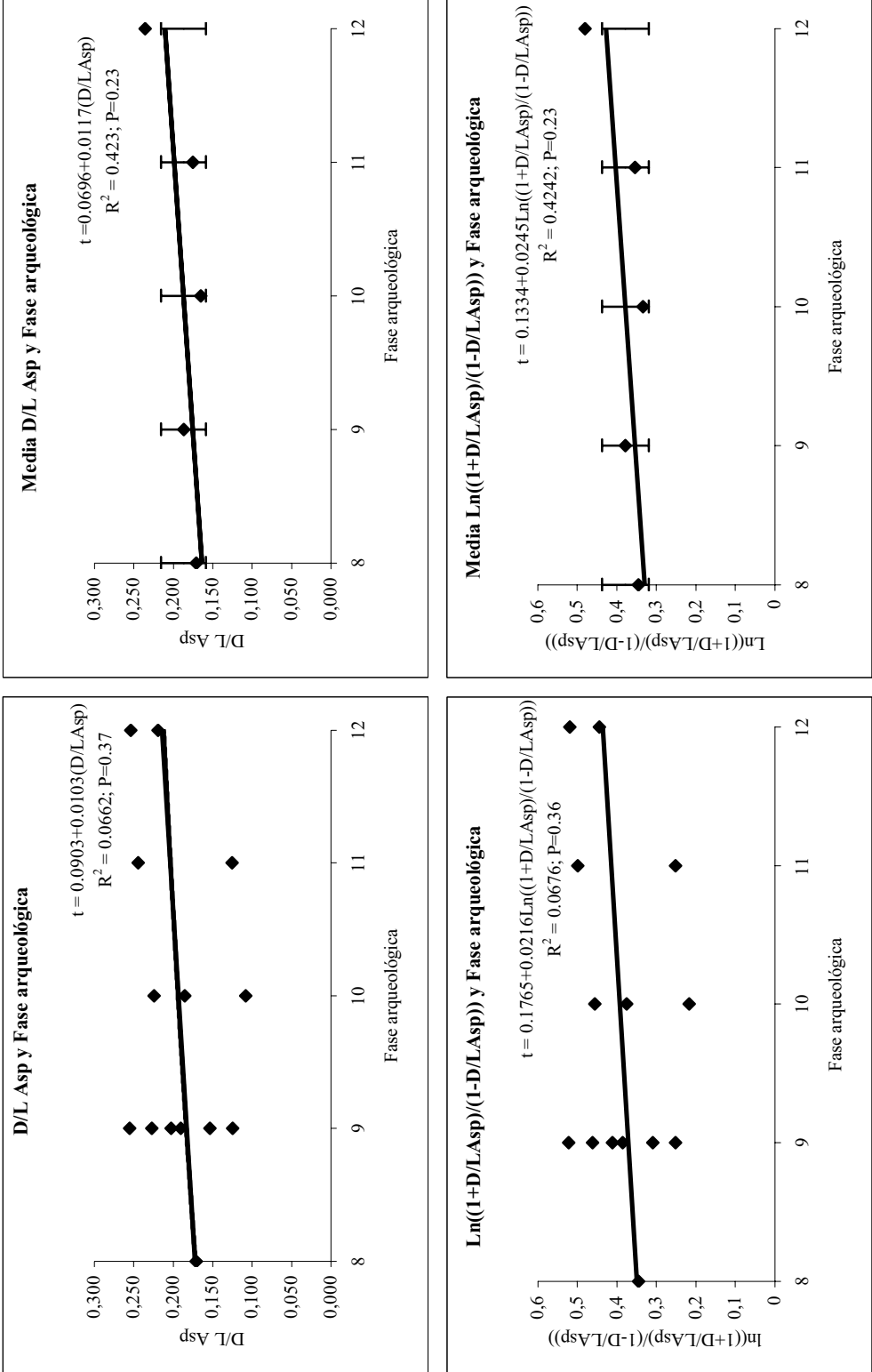
Las diferencias en las ratios de racemización dentro de un mismo yacimiento pueden ser reflejo de un diferente estado de degradación relacionado con la acción desigual de ciertos factores tafonómicos sobre las muestras (temperatura, pH, técnicas de embalsamamiento...). Sin embargo también pueden estar causadas por diferencias en el tiempo de deposición de los restos. Los restos del yacimiento de Tell Halula, aunque pertenecientes al mismo período cronológico –Neolítico pre-cerámico B ó PPNB–, proceden de diferentes casas y fases arqueológicas (**Tabla MA6** y **Figura FMA2** del capítulo “Métodos”).

Los **gráficos FR4** y **FR5** muestran la relación entre los valores de D/L Asp (totales y medios) y las fases arqueológicas de procedencia de las muestras por orden creciente de antigüedad para las muestras de dentina. Las diferentes fases fueron numeradas por el personal arqueológico siguiendo el orden cronológico de excavación realizado. Así aquellas fases con la numeración más baja corresponden a los primeros niveles excavados situados más superficialmente mientras que aquellas con numeración superior corresponden a niveles inferiores excavados con posterioridad. Según algunos autores (MASTERS y BADA 1977; MITTERER y KRIAUSAKUL 1989; TORRES *et al.* 2002) para ratios de racemización bajas, comprendidas entre 0.0 y 0.40 puede asumirse un modelo de regresión lineal entre las ratios de racemización observadas y el tiempo de deposición. Por ello los datos fueron ajustados a un modelo de correlación lineal mediante la ecuación de la recta que aparece representada en el margen superior derecho de cada gráfico.

En los gráficos **FR6** y **FR7** se representa también el resultado del ajuste a un modelo de regresión lineal entre los valores (totales y medios) de $\text{Ln}((1+D/L_{\text{asp}})/(1-D/L_{\text{asp}}))$ y las diferentes fases arqueológicas también para dentina, descrito por otros autores (WEHMILLER y HARE 1971; KING y NEVILLE 1977; BADA y MAN 1980; MÜLLER 1984; MURRAY-WALLACE y KIMBER 1993; LLAMAS *et al.* 1999 y TORRES *et al.* 2002).

Ninguno de los dos modelos propuestos proporciona un ajuste significativo entre la ratio D/L Asp y la fase arqueológica de procedencia. Cuando se representa el valor medio de racemización dentro de cada fase y la fase de procedencia el ajuste mejora sustancialmente ($R^2 = 0.43$) aunque sigue sin ser significativo en ninguno de los dos modelos. La escasa pendiente de la curva es reflejo de la reducida diferencia cronológica entre las sucesivas fases. La magnitud de dichos intervalos es desconocida, aunque teniendo en cuenta que cada fase corresponde a un nivel de ocupación diferente, es de suponer que no debería ser superior a los 100 años (Miquel Molist, comunicación personal).

Figuras FR4, FR5, FR6 y FR7. Relación entre las ratios D/L Asp individuales (**FR4** , superior izquierda) y medios ($\pm 1\sigma$) (**FR5**, superior derecha) de las muestras de dentina del yacimiento de Tell Halula y la fase arqueológica de procedencia. Los dos gráficos inferiores muestran la relación entre los valores de $\text{Ln}((1+D/L\text{Asp})/(1-D/L\text{Asp}))$ individuales (**FR6**, inferior izquierda) y medios ($\pm 1\sigma$) (**FR7**, inferior derecha). Se detalla a su vez dentro de cada gráfico la ecuación de ajuste a un modelo de regresión lineal, el coeficiente de correlación lineal (R^2) y su probabilidad asociada (P) para $\alpha=0.05$.

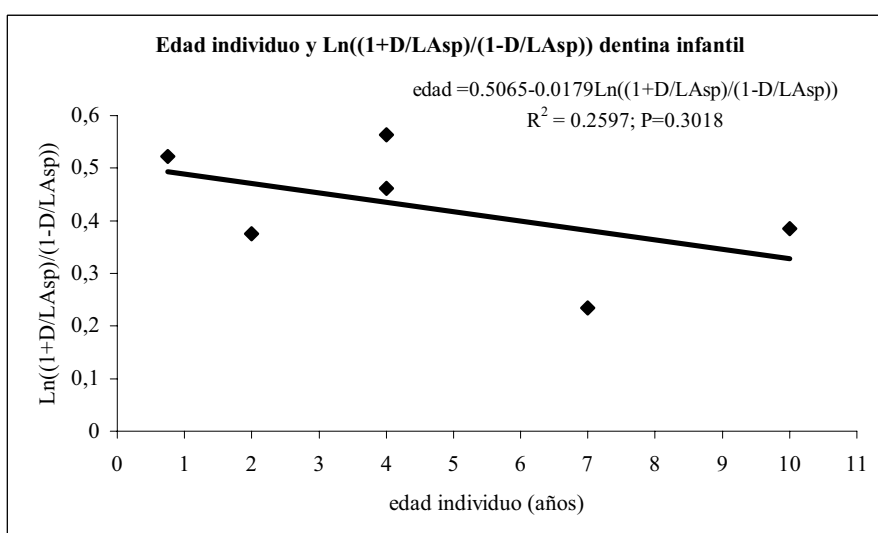
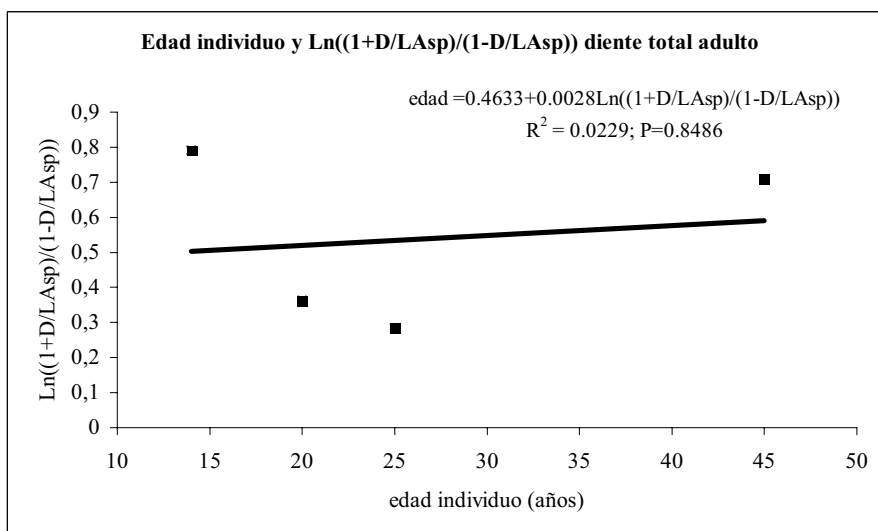
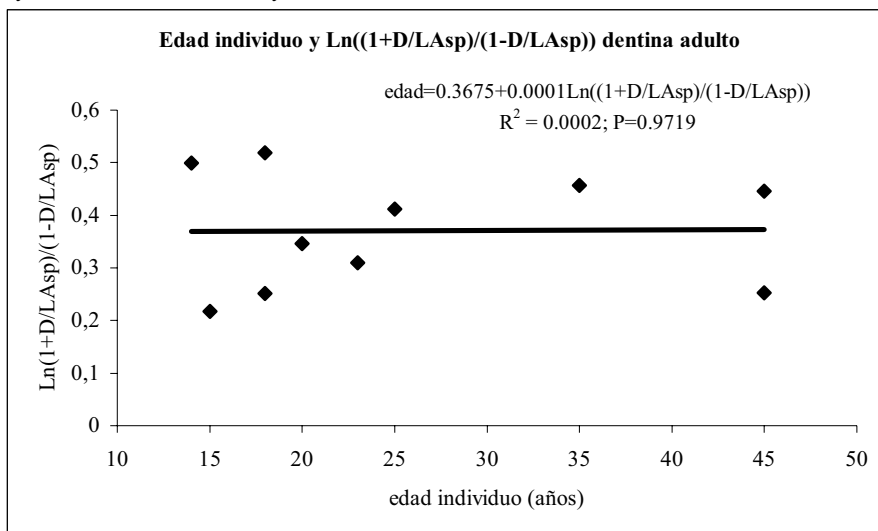


Aunque los datos obtenidos apuntan a la existencia de cierta relación entre la fase de procedencia de la muestra y su ratio D/L Asp, ésta no es suficiente para explicar la dispersión observada dentro del yacimiento de Tell Halula.

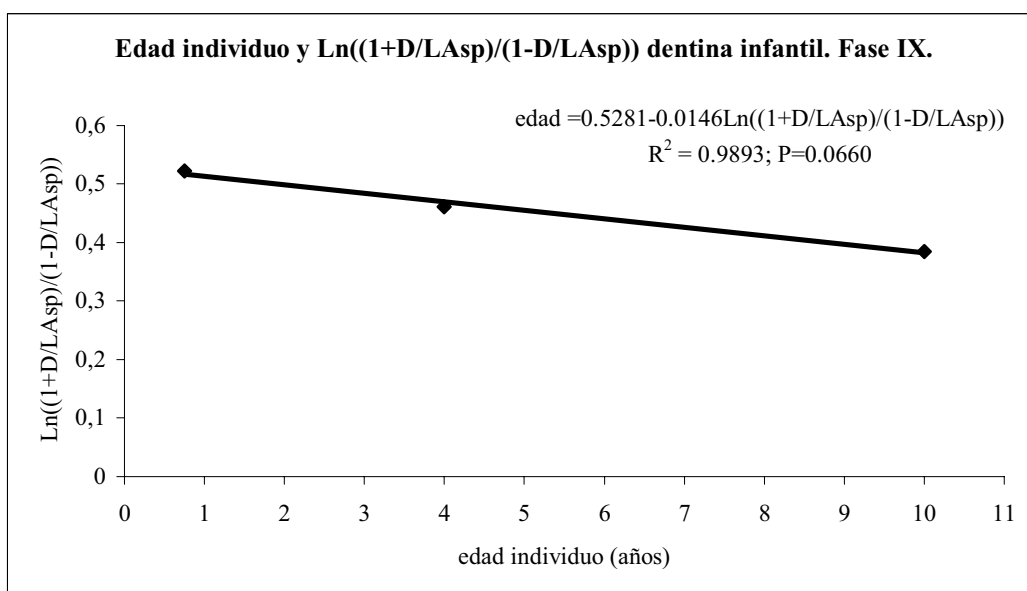
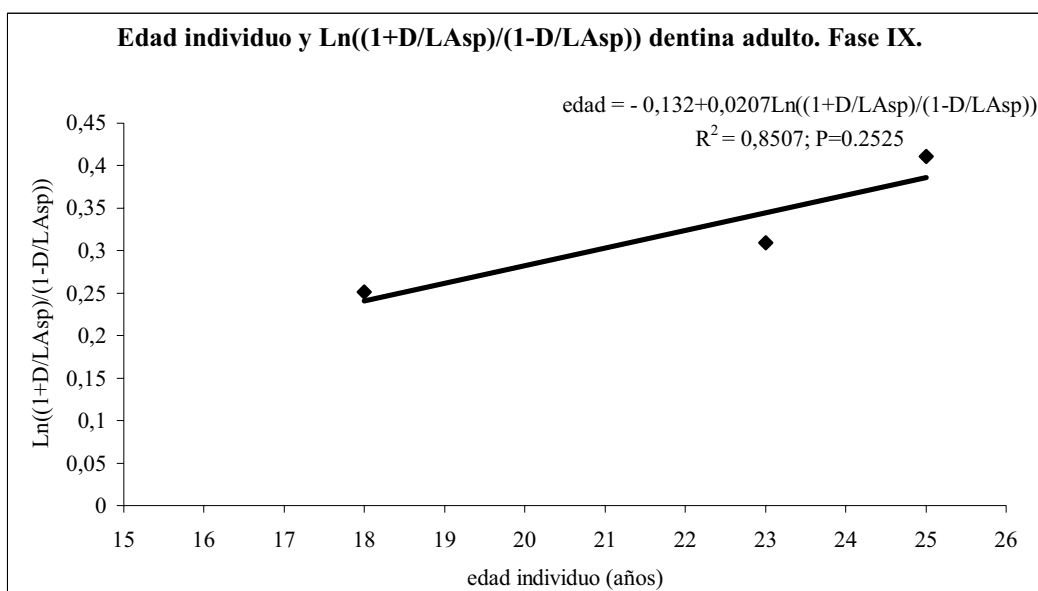
Otro factor que puede haber contribuido a dicha dispersión es la edad de cada individuo en el momento de la muerte. Aquellos tejidos con un escaso grado de renovación proteica, como los discos intervertebrales, la materia blanca del cerebro, el cristalino del ojo o la dentina sufren un proceso de racemización *in vivo*, que correctamente estimado puede ser utilizado para estimar la edad de la muerte del individuo (OGINO *et al.* 1985; OHTANI *et al.* 1990, 1991; RITZ-TIMME *et al.* 1990; FISHER *et al.* 1986; FUJII *et al.* 1989; GARNER *et al.* 1978; MAN *et al.* 1983; MASTERS *et al.* 1977, 1978; MURAOKA *et al.* 1987). Teniendo en cuenta esto último la racemización de un resto arqueológico estimada en uno de estos tejidos debería ser la suma de la racemización *in vivo* y aquella acontecida después de la muerte del organismo, es decir *post mortem*. Si suponemos que este último componente de la racemización global está sujeto a las condiciones tafonómicas del enterramiento y que éstas son constantes para un mismo entorno *i.e.* yacimiento arqueológico, la relación entre la ratio D/L Asp y la edad del individuo en el momento de la muerte debería mantenerse con el transcurso del tiempo.

En los gráficos **FR8** y **FR9** se ha representado la edad estimada de los individuos adultos –mayores de 10 años– del yacimiento neolítico de Tell Halula en el momento de la muerte y su grado de racemización expresado como $\ln((1+D/L)/(1-D/L))$ en dentina (**FR8**) y diente total (**FR9**). El “Test de correlación de Pearson” entre los pares de valores no muestra una asociación significativa entre ambas variables para ninguno de los dos tejidos analizados ($R^2_{\text{dentina}}=0.0002$, $P_{\text{dentina}}=0.9719$; $R^2_{\text{diente total}}=0.02292$, $P_{\text{diente total}}=0.8486$). De la misma forma tampoco existe un ajuste significativo a un modelo de regresión lineal en ninguno de los dos casos. El gráfico **FR10** muestra la relación entre el $\ln((1+D/L)/(1-D/L))$ de la dentina y la edad estimada de aquellos individuos con dentición decidual –menores de 10 años–. En este caso tampoco se aprecia una asociación significativa entre las dos variables ($R^2=0.2597$; $P=0.3018$) cuando se aplica el “Test de correlación de Pearson”.

Gráficos FR8, FR9 y FR10. Relación entre la ratio de racemización del ácido aspártico expresada como $\text{Ln}((1+D/L)/(1-D/L))$ en muestras de dentina (FR8) y diente total (FR9) y en muestras de dentina de individuos infantiles (FR10) del yacimiento de Tell Halula y edad del individuo en el momento de la muerte.



Los gráficos **FR11** y **FR12** muestran respectivamente la relación entre la edad estimada de los individuos adultos e infantiles del yacimiento de Tell Halula procedentes de una misma fase arqueológica (fase IX) y la racemización del ácido aspártico en dentina, expresada como $\text{Ln}((1+D/L \text{ Asp})/(1-D/L \text{ Asp}))$.



Gráficos FR11 y FR12. Relación entre la ratio de racemización del ácido aspártico expresada como $\text{Ln}((1+D/L)/(1-D/L))$ en dentina y la edad del individuo en el momento de la muerte en los individuos pertenecientes a la Fase IX del yacimiento de Tell Halula. Se detalla, a su vez, dentro de cada gráfico la ecuación de ajuste a un modelo de regresión lineal. R^2 =coeficiente de regresión lineal; P = Probabilidad del ajuste de la recta a un modelo de regresión lineal con $\alpha=0,05$.

En ninguno de los dos casos existe un ajuste significativo al modelo de regresión lineal. Sin embargo los coeficientes de regresión son muy elevados en ambos casos. Los resultados parecen apuntar a que la relación entre la edad del individuo en el momento de la muerte y la ratio de racemización del ácido aspártico corregida, observada *in vivo*, se mantiene incluso después de permanecer el resto depositado durante largos períodos de tiempo. Con todo, el escaso número de muestras analizadas de una misma fase arqueológica impide extraer conclusiones definitivas a este respecto.

La **Tabla R6** muestra también que existen diferencias en las ratios D/LAsp para un mismo tejido entre los yacimientos arqueológicos estudiados. En las muestras de dentina el yacimiento con unos valores medios de D/LAsp mayores es Tell Halula mientras que en muestras de diente total es el Tres Montes. Para tratar de determinar si estas diferencias pueden ser atribuidas a la antigüedad de las muestras estudiadas en la **Tabla R7** se resume la estadística básica de las ratios de racemización del ácido aspártico en diferentes clases de edad y tejido. En los gráficos **FR13–FR20** se representa la relación entre las clases de edad y la ratio D/L Asp.

Tabla R7. Estadística básica de las ratios de racemización del ácido aspártico (Asp) para diferentes clases de edad y tejido. Calcolítico: yacimientos de Abauntz, Tres Montes y Mari. Neolítico antiguo: yacimientos de Tell Halula, Tell Ramad y Dja'de. N= Número de muestras estudiadas; SD=Desviación estándar; CV= Coeficiente de variación.

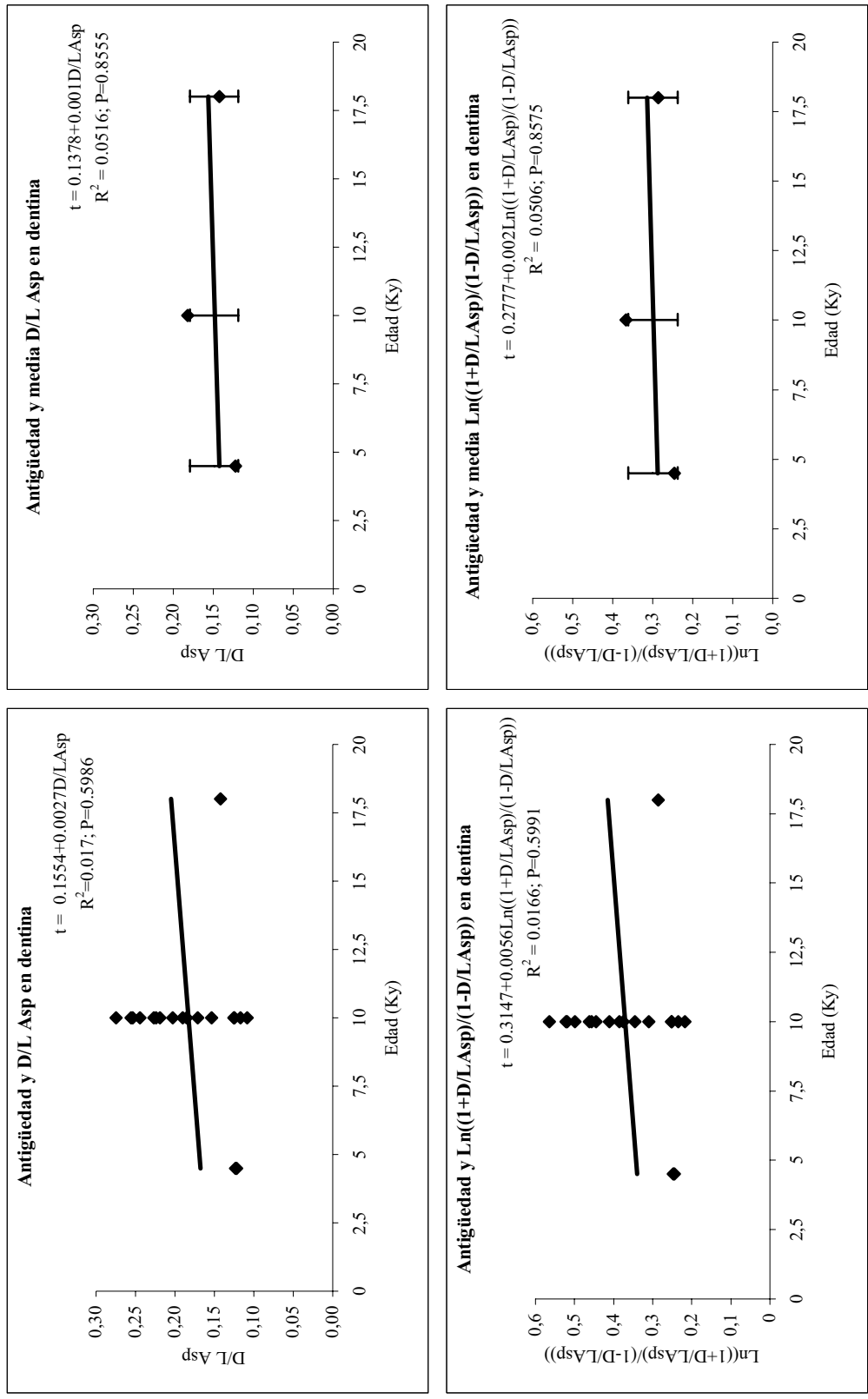
Clases edad	Edad	Tejido	n	Media D/L Asp	SD D/L Asp	D/L Asp mínimo	D/L Asp máximo	%CV (SD/media)
Calcolítico	4500 A.P.	dentina	2	0.122	0.001	0.122	0.123	0.69
Calcolítico	4500 A.P.	diente total	8	0.141	0.155	0.087	0.551	110.09
Paleolítico	18000 A.P.	dentina	1	0.142	-	-	-	-
Neolítico	5875 A.P.	hueso	1	0.272	-	-	-	-
Neolítico	6800 B.P.	diente total	1	0.107	-	-	-	-
Neolítico antiguo	10000 A.P.	dentina	17	0.182	0.054	0.108	0.275	29.71
Neolítico antiguo	10000 A.P.	diente total	6	0.205	0.107	0.108	0.275	51.92
Neolítico antiguo	10000 A.P.	hueso	3	0.175	0.049	0.205	0.212	28.22

Los gráficos obtenidos muestran que la relación entre las ratios de racemización de las muestras de dentina y su antigüedad no se ajusta a un modelo de regresión lineal. Cuando se emplearon todos los datos para la construcción de estos mismos gráficos en diente total, tampoco se obtuvo un ajuste significativo a este modelo ni para los todos

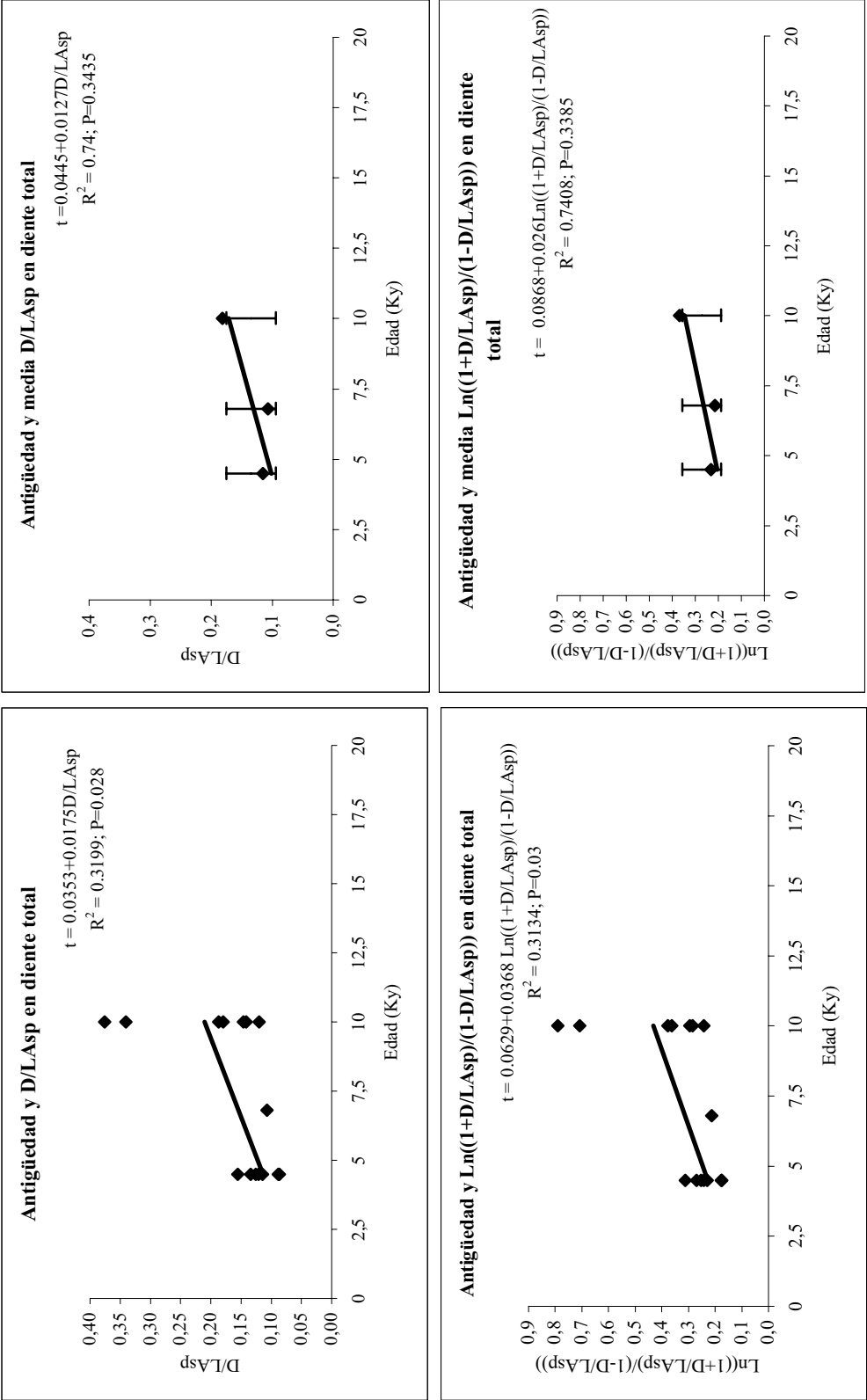
los valores de racemización ($t=0,1321+0,0076D/LAsp$, $R^2= 0,0269$, $P=0,5454$; $t=0,2867+0,014 \ln((1+D/LAsp)/(1-D/LAsp))$, $R^2=0,018$; $P=0,5454$) ni para los valores medios ($t=0,0587+0,013D/LAsp$, $R^2=0,5144$, $P=0,4953$; $t=0,1147+0,0268 \ln((1+D/LAsp)/(1-D/LAsp))$, $R^2= 0,5182$, $P=0,4880$).

Si se elimina del análisis el valor de racemización correspondiente a la muestra TM5 –superior a otros valores del mismo yacimiento– el ajuste al modelo de regresión lineal es significativo (**Figuras FR17-FR20**).

Figuras FR13, FR14, FR15 y FR16. Relación entre las ratios D/L Asp individuales (**FR13**, superior izquierda) y medias ($\pm 1\sigma$) (**FR14**, superior derecha) de las muestras de dentina y su antigüedad. Los dos gráficos inferiores muestran la relación entre los valores de $\text{Ln}((1+D/L\text{Asp})/(1-D/L\text{Asp}))$ individuales (**FR15**, inferior izquierda) y medios ($\pm 1\sigma$) (**FR16**, inferior derecha). Se detalla a su vez dentro de cada gráfico la ecuación de ajuste a un modelo de regresión lineal, el coeficiente de correlación lineal (R^2) y su probabilidad asociada (P) para $\alpha=0.05$.



Figuras FR17, FR18, FR19 y FR20. Relación entre las ratios D/L Asp individuales (FR17, superior izquierda) y medias ($\pm 1\sigma$) (FR18, superior derecha) de las muestras de diente total (exceptuando TM5) y su antigüedad. Los dos gráficos inferiores muestran la relación entre los valores de $\text{Ln}((1+D/L\text{Asp})/(1-D/L\text{Asp}))$ individuales (FR17, inferior izquierda) y medios ($\pm 1\sigma$) (FR18, inferior derecha) en estas mismas muestras. Se detalla a su vez dentro de cada gráfico la ecuación de ajuste a un modelo de regresión lineal, el coeficiente de correlación lineal (R^2) y su probabilidad asociada (P) para $\alpha=0.05$.



2.2.2.4. Relación entre la ratio de racemización del ácido aspártico y la preservación del material genético

Algunos estudios sugieren que existe una relación entre el grado de racemización, expresado como la ratio de las isoformas D y L, y el estado de preservación de la muestra, que se manifiesta en la capacidad de obtener información genética fiable a partir del mismo (POINAR *et al.* 1996; POINAR 2002). Para evaluar esta hipótesis, en aquellas muestras en las que había sido estimada la ratio D/L Asp, se examinó la relación de dicha ratio con dos variables: el número (y/o porcentaje) de secuencias obtenidas y la eficiencia de amplificación.

En la **Tabla R8** se presentan el número y porcentaje de extractos de DNA a partir de los cuales se obtuvieron *secuencias auténticas* (para definición consultar apartado 14 del capítulo “Métodos”) en ocho intervalos de D/L Asp. El reducido número de muestras en las que se estimaron la composición de aminoácidos y la ratio de isoformas D y L y que no produjeron secuencias auténticas impide realizar una comparación estadística entre los resultados de los diferentes intervalos. A pesar de ello a simple vista puede apreciarse que el incremento del ratio D/L Asp no conlleva una disminución del porcentaje de secuencias auténticas obtenidas, tal y como cabría esperar si ambas variables estuvieran fuertemente correlacionadas.

Tabla R8. Número y porcentaje de extractos de DNA a partir de los cuales se obtuvieron secuencias auténticas según los criterios establecidos en el apartado 14 del capítulo “Métodos”. El extracto de H19 no fue incluido puesto que la extracción y la amplificación de su material genético no llegó a realizarse.

Intervalo D/L Asp	Nº extractos		
	con secuencia auténtica	total	%
<0.1	2	2	100
0.1-0.15	14	16	87.5
0.15-0.2	7	7	100
0.2-0.25	4	7	57.14
0.25-0.3	3	3	100
0.3-0.35	0	1	0
0.35-0.40	1	1	100
>0.40	1	1	100
Total	32	38	84.21

Para examinar el grado de correlación entre la ratio D/L Asp y la *eficiencia de amplificación* se estimó el “coeficiente de correlación de Pearson” y el “coeficiente de regresión lineal” entre la eficiencia de amplificación (calculada como se describe en el apartado 15.1.1. del capítulo “Métodos”) y la ratio D/L Asp en diferentes subgrupos de muestras. Los resultados del análisis se muestran en la **Tabla R9** y en las **Figuras FR21, FR22, FR23 y FR24**.

En ninguno de los grupos estudiados se aprecia una correlación significativa entre ambas variables. De todos ellos, el que muestra un mayor coeficiente de correlación y una P menor, es el “diente total”.

Tabla R9. Coeficientes de correlación de Pearson (R , R^2) y de regresión lineal (R^2) entre las eficiencias de amplificación y las ratios D/L Asp, calculados a partir de valores individuales y sobre intervalos en diferentes subconjuntos de muestras. Todos valores: todas las muestras analizadas, incluyendo aquellas en las que se realizaron dos medidas independientes, una sobre diente total y otra sobre dentina. Todos valores *: todas las muestras analizadas, excluyendo la medida correspondiente a diente total en aquellos especímenes en los que se realizaron dos medidas independientes.

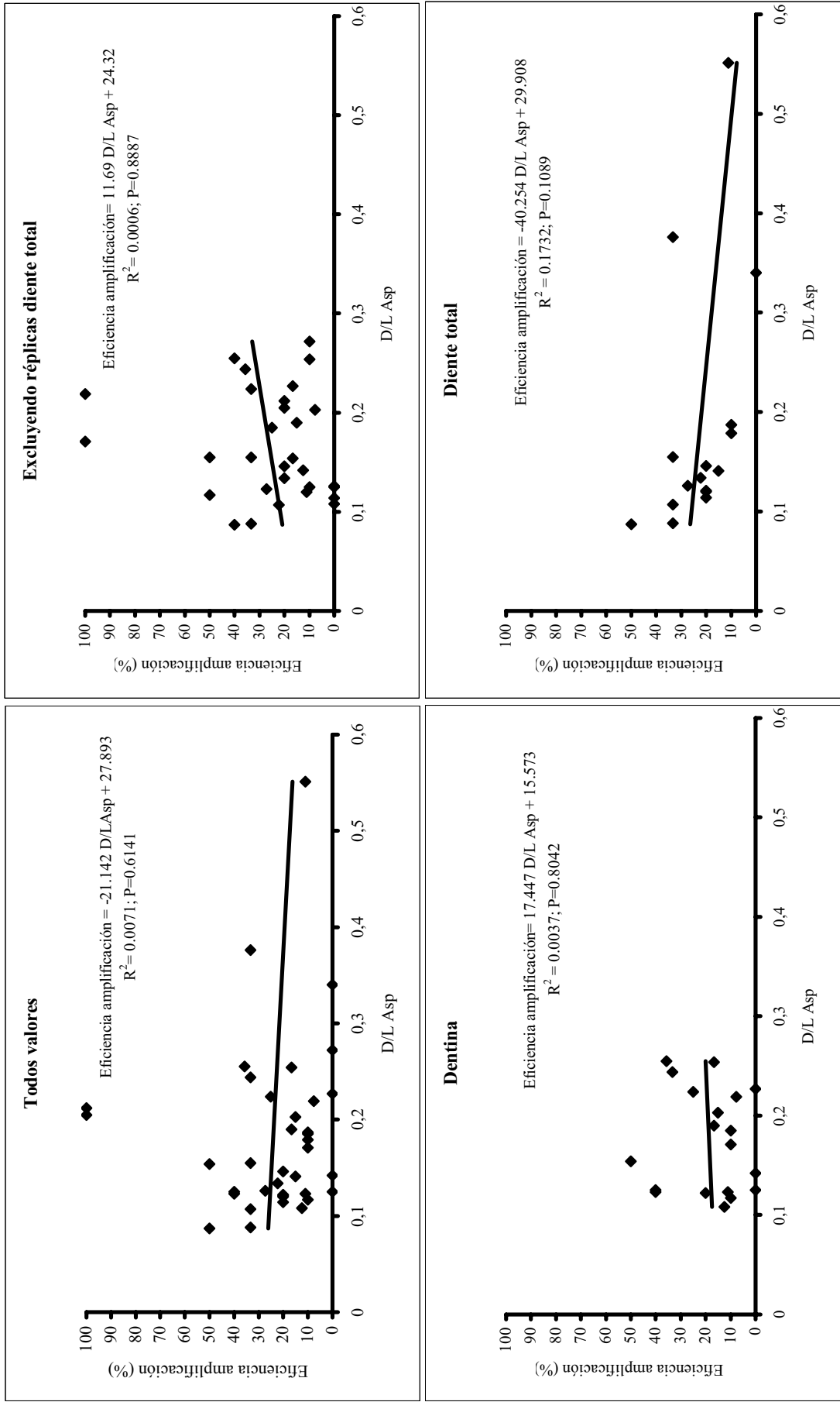
		Correlación Pearson; $\alpha=0,05$			Regresión lineal; $\alpha=0,05$			
		R	R^2	P	R^2	Intersección	Pendiente	P
Valores individuales D/L Asp	Todos valores	-0.0844	0.0071	0.6141 (ns)	0.0071	27.89 ± 8.480	-21.14 ± 41.57	0.6141 (ns)
	Todos valores*	0.0262	0.0006	0.8887 (ns)	0.0006	24.32 ± 14.25	11.69 ± 82.74	0.8887 (ns)
	Dentina	0.0609	0.0037	0.8042 (ns)	0.0037	15.57 ± 12.57	17.45 ± 69.30	0.8042 (ns)
	Diente total	-0.4162	0.1732	0.1089 (ns)	0.1732	29.91 ± 5.241	-40.25 ± 23.51	0.1089 (ns)
Intervalos D/L Asp	Todos valores	-0.3440	0.1183	0.4041 (ns)	0.1183	30.37 ± 10.80	-1.92 ± 2.139	0.4041 (ns)
	Todos valores*	-0.1423	0.0202	0.8194 (ns)	0.0202	29.42 ± 12.52	-0.94 ± 3.77	0.8194 (ns)
	Dentina	0.5149	0.2651	0.4851 (ns)	0.2651	11.69 ± 8.134	2.52 ± 2.97	0.4851 (ns)
	Diente total	-0.8347	0.6968	0.1653 (ns)	0.6968	39.20 ± 8.801	-6.89 ± 3.21	0.1653 (ns)

Se compararon además el número total de amplificaciones positivas obtenidas en el conjunto de muestras analizadas entre diferentes intervalos de D/L Asp (**Tabla R10**) en diferentes subgrupos de muestras. No se observaron tampoco diferencias significativas entre las clases. El conjunto de muestras con un valor de P menor –tanto para la “prueba χ^2 ” como para la “prueba de diferenciación exacta de Fisher”– corresponde a “diente total”.

Tabla R10. Número y porcentaje de ampliificaciones positivas en diferentes intervalos de D/L Asp y diferentes conjuntos de muestras. Todos valores: todas las muestras analizadas, incluyendo aquellas en las que se realizaron dos medidas independientes, una sobre diente total y otra sobre dentina. Todos valores *: todas las muestras analizadas, excluyendo la medida correspondiente a diente total en aquellos especímenes en los que se realizaron dos medidas independientes. La tabla incluye también el resultado de la prueba χ^2 y de la prueba de Fisher entre las diferentes clases. g.d.l.: grados de libertad.

Intervalos D/L Asp	Todos valores						Todos valores*						Dentina						Diente total					
	+	Total	%	χ^2	g.d.l.	P	+	Total	%	χ^2	g.d.l.	P	+	Total	%	χ^2	g.d.l.	P	+	Total	%	χ^2	g.d.l.	P
≤ 0.1	7	24	29.16	3.10	4	0.54	7	24	29.16	3.25	4	0.51	-	-	-	0.29	3	0.39	6	16	37.50	4.02	2	0.13
$>0.1-0.15$	25	128	19.53				17	84	20.23				10	57	17.54				13	65	20.00			
$0.15-0.2$	12	82	14.63				9	52	17.30				7	46	15.21				5	36	13.80			
$0.2-0.25$	10	51	19.60				10	51	19.60				8	65	12.30				4	24	16.60			
$0.25-0.3$	5	14	37.50				5	14	35.70				7	26	26.92									
$0.3-0.35$	0	6	0.00	-	-	-	-	-	-				-	-	-				-	-	-			
$0.35-0.40$	3	9	33.3	-	-	-	-	-	-				-	-	-				-	-	-			
>0.40	1	9	11.10	-	-	-	-	-	-				-	-	-				-	-	-			
				Fisher P						Fisher P						Fisher P						Fisher P		
≤ 0.1	7	24	29.16	0.27			7	24	29.16	0.30			-	-	-	-	-	-	6	16	37.50	0.09		
>0.1	53	285	18.59				41	201	20.39				-	-	-	-	-	-	22	125	17.60			
<0.15	29	138	21.01	0.56			24	108	22.22	0.87			10	57	17.54	0.83			19	81	23.45	0.26		
>0.15	31	171	18.12				24	117	20.51				22	137	16.05				9	60	15.00			

Figuras FR21, FR22, FR23 y FR24. Regresión lineal entre la eficiencia de amplificación y la ratio D/L Asp en diferentes conjuntos de muestras.



2.2.2.5. Relación entre las ratios de racemización de diversos aminoácidos y contaminación

Según POINAR *et al.* 1996 la relación $D/L \text{ Asp} > D/L \text{ Ala} > D/L \text{ Leu}$ es indicativa de la ausencia de contaminación de la muestra con aminoácidos exógenos durante el proceso de deposición. En el presente trabajo estos tres aminoácidos pudieron estimarse conjuntamente únicamente en tres casos. En nueve casos se obtuvieron medidas de ácido aspártico y alanina y en tres casos de ácido aspártico y leucina.

En todos ellos la ratio D/L del ácido aspártico es superior a la de los otros dos aminoácidos y –exceptuando a TR18 y H30– se cumple la relación propuesta por Poinar y colaboradores. En ambas muestras la relación entre las isoformas D y L de la leucina es mayor que la de la alanina. Estos resultados pueden ser debidos a errores en la estima de la ratio entre las dos isoformas provocados por la escasez de formas D, próximas al límite de detección del sistema. Puesto que en estas dos muestras la ratio D/L Asp es superior a la de la alanina y la leucina, no puede hablarse de contaminación con aminoácidos exógenos.

3. CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE mtDNA

En la **Tabla R11** se resumen los resultados de cuantificación –obtenidos como se describe en el apartado 2.2 del capítulo “Métodos”– expresados en número de copias por volumen de extracto analizado (5µl), en la totalidad del extracto original (nº copias extracto), y por miligramo de hueso. Aquellos análisis en los que no se obtuvieron resultados por fallo de la reacción de amplificación se señalan con un guión (-). La tabla incluye, además, los resultados del test de inhibición realizado en alguno de los extractos.

Tabla R11. Resultados de cuantificación obtenidos en las muestras analizadas. Se cuantificó cada extracto por duplicado en la misma reacción (réplicas 1 y 2). En las muestras extraídas en el presente trabajo, se estimó el nº copias por extracto y por mg de hueso. Media: media aritmética de las dos réplicas. SD: Desviación estándar. +: Resultado positivo de inhibición. -: Resultado negativo de inhibición.

Yacimiento	Individuo	Muestra	Réplica 1	Réplica 2	Media	SD	Nº copias extracto	Nº copias /mg hueso	Inhibición		
									5µl	3µl	1.5µl
Abauntz	AB27	AB3	8.10 x10 ⁴	1.25 x10 ⁵	1.03 x10 ⁵	3.11 x10 ⁴	1.81 x10 ⁷	2.66 x10 ⁴			
Abauntz	ABb1.1	AB5	4.73 x10 ⁴	6.77 x10 ⁴	5.75 x10 ⁴	1.44 x10 ⁴	2.30 x10 ⁶	3.59 x10 ³			
Abauntz	ABb1.2	AB6	8.80 x10 ⁴	9.31 x10 ⁴	9.06 x10 ⁴	3.58 x10 ³	1.70 x10 ⁷	2.58 x10 ⁴			
Abauntz	AB29F	1AB8	1.29 x10 ⁴	5.11 x10 ⁴	3.20 x10 ⁴	2.70 x10 ⁴	2.56 x10 ⁶	8.00 x10 ³	+	+	-
Abauntz	AB23C	AB9	6.33 x10 ⁴	1.19 x10 ⁵	9.11 x10 ⁴	3.94 x10 ⁴	6.38 x10 ⁶	9.38 x10 ³	-	-	-
Abauntz	AB21E	AB11	1.70 x10 ⁵	2.25 x10 ⁵	1.97 x10 ⁵	3.88 x10 ⁴	2.56E+07	4.01 x10 ⁴			
Abauntz	AB21D	AB13	5.97 x10 ⁴	5.04 x10 ⁴	5.51 x10 ⁴	6.61 x10 ³	4.96 x10 ⁶	7.74 x10 ³	-	-	-
Abauntz	AB17C	AB14	4.29 x10 ⁴	2.42 x10 ⁴	3.35 x10 ⁴	1.32 x10 ⁴	2.75 x10 ⁶	4.17 x10 ³	-	-	-
Abauntz	AB35F	AB15	3.81 x10 ⁴	1.05 x10 ⁵	7.14 x10 ⁴	4.70 x10 ⁴	1.38 x10 ⁷	2.31 x10 ⁴	P	-	-
Abauntz	AB35E	AB17	9.51 x10 ⁴	9.07 x10 ⁴	9.29 x10 ⁴	3.10 x10 ³	1.49 x10 ⁷	2.15 x10 ⁴			
Abauntz	AB25E	AB20	3.02 x10 ⁴	3.29 x10 ⁴	3.16 x10 ⁴	1.88 x10 ³	3.88 x10 ⁶	6.36 x10 ³	-	-	-
Abauntz	AB25D	AB21	1.70 x10 ⁵	6.52 x10 ⁴	1.18 x10 ⁵	7.40 x10 ⁴	1.06 x10 ⁷	1.51 x10 ⁴			
Açikli	7 AH89	10SK4									
Açikli	8a AH89	16SK2	1.49 x10 ⁴	2.59 x10 ⁴	2.04 x10 ⁴	7.75 x10 ³			-	-	-
Açikli	AH 95 2c-1	SK106									
Açikli	AH 95 2c-3	SK109									
Caldeirão	O12 194	CA4	2.02 x10 ⁵	7.49 x10 ⁵	4.76 x10 ⁵	3.87 x10 ⁵					
Caldeirão	O10 107	CA7	3.76 x10 ⁴	2.67 x10 ⁴	3.21 x10 ⁴	7.71 x10 ³	6.10 x10 ⁶	9.84 x10 ³	-	-	-
Dja'de	SK-A2	DJ1	6.86 x10 ⁴	6.38 x10 ⁴	6.62 x10 ⁴	3.41 x10 ³	1.06 x10 ⁶	1.83 x10 ³			
Dja'de	SK-D4 16	DJ3	3.71 x10 ⁴	5.82 x10 ⁴	4.77 x10 ⁴	1.49 x10 ⁴	5.72 x10 ⁶	9.37 x10 ³			
Dja'de	SK-N4	1DJ4	2.55 x10 ⁴	2.38 x10 ⁴	2.46 x10 ⁴	1.20 x10 ³	6.89 x10 ⁵	1.13 x10 ³			
Dja'de	SK-R 3	1DJ6	3.07 x10 ⁴	3.73 x10 ⁴	3.40 x10 ⁴	4.62 x10 ³	2.58 x10 ⁶	4.24 x10 ³			
Dja'de	SK-R 3	2DJ6	4.95 x10 ⁴	2.26 x10 ⁴	3.60 x10 ⁴	1.90 x10 ⁴	8.65 x10 ⁵	2.34 x10 ³			
Mari	1	1MA1	6.10 x10 ⁴	1.87 x10 ⁴	3.98 x10 ⁴	2.99 x10 ⁴	5.58 x10 ⁶	8.72 x10 ³	+	P	-
Mari	2	2MA2	4.84 x10 ⁴	3.13 x10 ⁴	3.99 x10 ⁴	1.21 x10 ⁴	6.30 x10 ⁶	1.02 x10 ⁴	+	-	-
Mari	3	1MA3	7.52 x10 ⁴	4.07 x10 ⁴	5.79 x10 ⁴	2.44 x10 ⁴	5.79 x10 ⁶	1.66 x10 ⁴	+	-	-
Mari	4	1MA4	8.47 x10 ⁴	6.52 x10 ⁴	7.49 x10 ⁴	1.38 x10 ⁴	8.92 x10 ⁶	1.44 x10 ⁴	P	-	-
Mari	4	2MA4	5.76 x10 ⁴	2.60 x10 ⁴	4.18 x10 ⁴	2.23 x10 ⁴	3.22 x10 ⁶	6.57 x10 ³	+	-	-
Mari	5	1MA5	4.63 x10 ⁴	6.52 x10 ⁴	5.58 x10 ⁴	1.33 x10 ⁴	3.35 x10 ⁶	7.97 x10 ³	+	-	-
Mari	6	1MA6	2.28 x10 ⁵	2.17 x10 ⁵	2.23 x10 ⁵	7.33 x10 ³	8.90 x10 ⁶	1.51 x10 ⁴	P	P	-
Mari	8	1MA8	5.26 x10 ⁴	1.06 x10 ⁵	7.93 x10 ⁴	3.78 x10 ⁴	5.79 x10 ⁶	9.81 x10 ³	+	-	-
Mari	10	2MA10	2.38 x10 ⁴	6.98 x10 ⁴	4.68 x10 ⁴	3.25 x10 ⁴	3.65 x10 ⁶	5.71 x10 ³	P	-	-

Tabla R11. (Continuación).

Yacimiento	Individuo	Muestra	Réplica 1	Réplica 2	Media	SD	Nº copias extracto	Nº copias/ mg hueso	Inhibición		
									5µl	3µl	1.5µl
Mari	11	3MA11	1.65 x10 ⁴	5.93 x10 ⁴	3.79 x10 ⁴	3.02 x10 ⁴	3.19 x10 ⁶	4.75 x10 ³	+	-	-
Mari	12	1MA12		8.14 x10 ⁴			1.68 x10 ⁷	2.89 x10 ⁴	P	-	-
Nerja	NE-1829	1NE	8.68 x10 ⁴	1.68 x10 ⁵	1.27 x10 ⁵	5.71 x10 ⁴	6.99 x10 ⁶	9.08 x10 ³	-	-	-
Nerja	NE-1829	5NE	2.50 x10 ⁴	7.74 x10 ³	1.64 x10 ⁴	1.22 x10 ⁴	4.74 x10 ⁵	6.00 x10 ²	-	-	-
Nerja	NE-1829	5NE	1.89 x10 ⁴	1.57 x10 ⁴	1.73 x10 ⁴	2.30 x10 ³					
Nerja	NE-NM82.2	2NE	1.14 x10 ⁵	3.33 x10 ⁴	7.35 x10 ⁴	5.69 x10 ⁴	5.00 x10 ⁶	6.49 x10 ³	-	-	-
Nerja	NE-NT79	3NE		2.44 x10 ⁴					-	-	-
Nerja	NE-NT79	3NE									
Nerja	NE-NT79	3NE	6.55 x10 ²	2.19 x10 ³	1.42 x10 ³	1.08 x10 ³	9.66 x10 ⁴	1.32 x10 ²			
Nerja	NE-NAP	4NE	1.86 x10 ⁵	2.55 x10 ⁵	2.21 x10 ⁵	4.86 x10 ⁴	1.06 x10 ⁷	1.43 x10 ⁴	-	-	
El Pirulejo	1PI	1PI							+	P	-
El Pirulejo	2PI	2PI	5.64 x10 ⁴	5.77 x10 ⁴	5.70 x10 ⁴	9.52 x10 ²	1.14 x10 ⁶	1.48 x10 ³			
Sant Pau	2 7608	SP2	6.16 x10 ⁴	1.15 x10 ⁵	8.82 x10 ⁴	3.76 x10 ⁴	9.27 x10 ⁶	1.97 x10 ⁴			
Sant Pau	6 7214	1SP6	6.66 x10 ⁴	1.05 x10 ⁵	8.57 x10 ⁴	2.71 x10 ⁴	8.57 x10 ⁶	4.08 x10 ⁴			
Sant Pau	6 7214	2SP6	1.32 x10 ⁵	1.27 x10 ⁵	1.29 x10 ⁵	3.84 x10 ³	3.10 x10 ⁶	2.82 x10 ⁴			
Sant Pau	7 7720	1SP7	3.91 x10 ⁴	9.44 x10 ⁴	6.68 x10 ⁴	3.91 x10 ⁴	7.35 x10 ⁵	1.20 x10 ³			
Sant Pau	7 7720	2SP7	5.87 x10 ⁴	1.60 x10 ⁵	1.09 x10 ⁵	7.13 x10 ⁴	1.53 x10 ⁷	2.39 x10 ⁴			
Sant Pau	18 7758	1SP18	1.04 x10 ⁵	1.09 x10 ⁵	1.07 x10 ⁵	3.69 x10 ³	1.60 x10 ⁷	2.39 x10 ⁴			
Sant Pau	18 7758	2SP18	6.43 x10 ⁴	4.93 x10 ⁴	5.68 x10 ⁴	1.06 x10 ⁴	5.00 x10 ⁶	8.33 x10 ³			
Sant Pau	19 7928	SP19	1.28 x10 ⁵	1.83 x10 ⁵	1.56 x10 ⁵	3.95 x10 ⁴	7.78 x10 ⁶	1.25 x10 ⁴			
Tell Halula	H3	TH1	2.02 x10 ⁵	1.68 x10 ⁵	1.85 x10 ⁵	2.46 x10 ⁴	2.77 x10 ⁷	2.07 x10 ⁴			
Tell Halula	H3	TH2	7.38 x10 ⁴	1.97 x10 ⁵	1.35 x10 ⁵	8.68 x10 ⁴	3.38 x10 ⁶	5.54 x10 ³	-	-	-
Tell Halula	H4	TH3	2.25 x10 ⁵	4.19 x10 ⁵	3.22 x10 ⁵	1.37 x10 ⁵	9.65 x10 ⁷	1.44 x10 ⁵			
Tell Halula	H4	TH4	1.81 x10 ⁵	1.54 x10 ⁵	1.67 x10 ⁵	1.95 x10 ⁴	6.69 x10 ⁶	9.70 x10 ³	-	-	-
Tell Halula	H7	TH5	5.17 x10 ⁴	6.29 x10 ⁴	5.73 x10 ⁴	7.88 x10 ³	3.21 x10 ⁶	7.29 x10 ³	-	-	-
Tell Halula	H7	TH6	4.80 x10 ⁴	6.14 x10 ⁴	5.47 x10 ⁴	9.44 x10 ³	8.75 x10 ⁶	9.41 x10 ³			
Tell Halula	H8	TH7	6.08 x10 ⁴	8.33 x10 ⁴	7.20 x10 ⁴	1.59 x10 ⁴	7.20 x10 ⁵	1.13 x10 ³	P	-	-
Tell Halula	H8	TH8	4.21 x10 ⁴	4.12 x10 ⁴	4.16 x10 ⁴	6.24 x10 ²	8.32 x10 ⁶	9.57 x10 ³			
Tell Halula	H45	1H17	7.55 x10 ⁴	5.87 x10 ⁴	6.71 x10 ⁴	1.19 x10 ⁴	1.18 x10 ⁷	3.81 x10 ⁴			
Tell Halula	H68	H12	3.40 x10 ⁴	1.81 x10 ⁴	2.61 x10 ⁴	1.13 x10 ⁴	5.99 x10 ⁶	9.67 x10 ³			
Tell Halula	H37	2H20	5.86 x10 ⁴	7.73 x10 ⁴	6.80 x10 ⁴	1.33 x10 ⁴	1.97 x10 ⁶	3.28 x10 ³			
Tell Halula	H47	1H18	6.68 x10 ⁴	1.05 x10 ⁵	8.61 x10 ⁴	2.74 x10 ⁴	1.30 x10 ⁷	3.52 x10 ⁴			
Tell Halula	H49	1H15	1.04 x10 ⁵	3.88 x10 ⁴	7.14 x10 ⁴	4.62 x10 ⁴	9.86 x10 ⁶	1.79 x10 ⁴			
Tell Halula	H53	1H14	7.97 x10 ⁴	7.29 x10 ⁴	7.63 x10 ⁴	4.81 x10 ³	4.88 x10 ⁶	1.02 x10 ⁴			
Tell Halula	H56	1H16	8.99 x10 ⁴	6.43 x10 ⁴	7.71 x10 ⁴	1.81 x10 ⁴	9.25 x10 ⁶	1.71 x10 ⁴			
Tell Halula	H57	1H21	2.52 x10 ⁴	6.26 x10 ⁴	4.39 x10 ⁴	2.65 x10 ⁴	2.90 x10 ⁶	4.75 x10 ³			
Tell Halula	H64	2H13	8.65 x10 ⁴	6.48 x10 ⁴	7.57 x10 ⁴	1.53 x10 ⁴	1.07 x10 ⁷	1.68 x10 ⁴			
Tell Halula	H65	2H10	2.69 x10 ⁵	2.08 x10 ⁵	2.39 x10 ⁵	4.34 x10 ⁴	1.98 x10 ⁷	3.89 x10 ⁴			
Tell Halula	H66	1H9	1.01 x10 ⁵	1.26 x10 ⁵	1.14 x10 ⁵	1.73 x10 ⁴	4.77 x10 ⁶	1.08 x10 ⁴			
Tell Halula	H66	2H9	8.53 x10 ⁴	1.12 x10 ⁵	9.87 x10 ⁴	1.89 x10 ⁴	8.69 x10 ⁶	2.29 x10 ⁴			
Tell Halula	H70	2H11	1.47 x10 ⁵	1.55 x10 ⁵	1.51 x10 ⁵	6.19 x10 ³	1.81 x10 ⁷	3.18 x10 ⁴			
Tell Halula	H70	3H11	5.56 x10 ⁴	5.88 x10 ⁴	5.72 x10 ⁴	2.30 x10 ³	5.26 x10 ⁶	8.77 x10 ³			
Tell Ramad	R65-7I	TR1	1.70 x10 ⁵	1.09 x10 ⁵	1.40 x10 ⁵	4.28 x10 ⁴	1.12 x10 ⁷	1.51 x10 ⁴	-	-	-
Tell Ramad	R63-1	TR2	1.78 x10 ⁵	2.91 x10 ⁵	2.35 x10 ⁵	7.96 x10 ⁴	1.64 x10 ⁷	2.42 x10 ⁴			
Tell Ramad	R65(8)	TR3	8.10 x10 ⁴	8.99 x10 ⁴	8.54 x10 ⁴	6.33 x10 ³	9.91 x10 ⁶	1.42 x10 ⁴			
Tell Ramad	R65(8)	TR4	1.80 x10 ⁵	1.26 x10 ⁵	1.53 x10 ⁵	3.81 x10 ⁴	6.11 x10 ⁶	1.20 x10 ⁴	-	-	-
Tell Ramad	R65-10	TR5	1.07 x10 ⁵	1.32 x10 ⁵	1.20 x10 ⁵	1.77 x10 ⁴	1.08 x10 ⁷	2.11 x10 ⁴			
Tell Ramad	R65-10	TR6	2.33 x10 ⁵	2.22 x10 ⁵	2.27 x10 ⁵	7.86 x10 ³	2.27 x10 ⁷	3.29 x10 ⁴			
Tell Ramad	R65-1	TR7	2.02 x10 ⁴	1.08 x10 ⁵	6.39 x10 ⁴	6.19 x10 ⁴	1.53 x10 ⁷	2.44 x10 ⁴	-	-	-
Tell Ramad	R65-3I	TR8	6.72 x10 ⁴	7.40 x10 ⁴	7.06 x10 ⁴	4.80 x10 ³	6.63 x10 ⁶	9.21 x10 ³			

Tabla R11. (Continuación).

Yacimiento	Individuo	Muestra	Réplica 1	Réplica 2	Media	SD	Nº copias muestra	Nº copias/mg hueso	Inhibición		
									5µl	3µl	1.5µl
Tell Ramad	R65-4II	TR9	5.57 x10 ⁴	3.27 x10 ⁴	4.42 x10 ⁴	1.63 x10 ⁴	5.39 x10 ⁶	8.84 x10 ³	-	-	-
Tell Ramad	R65-4II	TR10									
Tell Ramad	R65-4II	TR11	3.95 x10 ⁴	7.71 x10 ⁴	5.83 x10 ⁴	2.66 x10 ⁴	1.52 x10 ⁷	2.49 x10 ⁴			
Tell Ramad	R65-14	TR12	3.33 x10 ³	2.43 x10 ⁴	1.38 x10 ⁴	1.49 x10 ⁴	5.26 x10 ⁵	7.51 x10 ²			
Tell Ramad	R65-C8-SEA	TR13							-	-	-
Tell Ramad	R69(2)	TR14	6.42 x10 ⁴	1.62 x10 ⁵	1.13 x10 ⁵	6.89 x10 ⁴	2.71 x10 ⁶	4.04 x10 ³	-	-	-
Tell Ramad	R69(2)	TR15	2.69 x10 ⁵	2.25 x10 ⁵	2.47 x10 ⁵	3.17 x10 ⁴	6.18 x10 ⁶	8.83 x10 ³	-	-	-
Tell Ramad	R65-C8-SEB	TR16	1.14 x10 ⁵	1.64 x10 ⁵	1.39 x10 ⁵	3.51 x10 ⁴	4.59 x10 ⁶	7.06 x10 ³			
Tell Ramad	R65-1S	TR18	1.04 x10 ⁷	3.01 x10 ⁷	2.03 x10 ⁷	1.39 x10 ⁷	1.48 x10 ⁹	2.55 x10 ⁶			
Tell Ramad	R66-4-400	TR19	6.77 x10 ⁴	9.08 x10 ⁴	7.93 x10 ⁴	1.64 x10 ⁴	8.32 x10 ⁶	1.41 x10 ⁴			
Toledo	K-13	TO1	5.36 x10 ⁴	6.68 x10 ⁴	6.02 x10 ⁴	9.39 x10 ³	1.08 x10 ⁷	1.90 x10 ⁴	P	P	P
Tres Montes	TM-2	2TM1	2.12 x10 ⁴	4.78 x10 ⁴	3.45 x10 ⁴	1.88 x10 ⁴	3.04 x10 ⁶	5.96 x10 ³	-	-	-
Tres Montes	TM-3	1TM2	3.23 x10 ⁴	5.21 x10 ⁴	4.22 x10 ⁴	1.40 x10 ⁴	7.22 x10 ⁶	1.11 x10 ⁴	-	-	-
Tres Montes	TM-5	TM3	1.87 x10 ⁵	5.83 x10 ⁴	1.23 x10 ⁵	9.13 x10 ⁴	2.58 x10 ⁶	4.16 x10 ³			
Tres Montes	TM-6	1TM4	3.51 x10 ⁵	2.76 x10 ⁴	1.89 x10 ⁵	2.28 x10 ⁵			-	-	-
Tres Montes	TM-6	1TM4	7.92 x10 ⁴	5.20 x10 ⁴	6.56 x10 ⁴	1.92 x10 ⁴	7.64 x10 ⁶	1.50 x10 ⁴			
Tres Montes	TM-6	2TM4	9.94 x10 ⁴	9.76 x10 ⁴	9.85 x10 ⁴	1.31 x10 ³	2.99 x10 ⁷	4.99 x10 ⁴			
Tres Montes	TM-8	1TM5	4.34 x10 ⁴	7.22 x10 ⁴	5.78 x10 ⁴	2.03 x10 ⁴	7.86 x10 ⁶	1.27 x10 ⁴	P	-	-
Tres Montes	TM-11	1TM6	4.33 x10 ⁴	3.81 x10 ⁴	4.07 x10 ⁴	3.67 x10 ³	9.28 x10 ⁶	1.43 x10 ⁴			
Tres Montes	TM-14	TM7	1.37 x10 ⁵	1.33 x10 ⁵	1.35 x10 ⁵	2.67 x10 ³	3.08 x10 ⁷	5.13 x10 ⁴			
Tres Montes	TM-15	TM8	2.22 x10 ⁵	3.28 x10 ⁵	2.75 x10 ⁵	7.51 x10 ⁴	1.32 x10 ⁷	2.00 x10 ⁴			
Tres Montes	TM-17	TM10	4.63 x10 ⁴	1.16 x10 ⁵	8.10 x10 ⁴	4.91 x10 ⁴	1.25 x10 ⁷	2.31 x10 ⁴	+	+	+
Tres Montes	TM-18	TM11	6.29 x10 ⁴	6.33 x10 ⁴	6.31 x10 ⁴	2.99 x10 ²	7.69 x10 ⁶	1.24 x10 ⁴	-	-	-
Tres Montes	TM-19	TM12	2.55 x10 ⁵	3.04 x10 ⁵	2.79 x10 ⁵	3.44 x10 ⁴	6.59 x10 ⁷	1.05 x10 ⁵			
Tres Montes	TM-20	TM13	3.21 x10 ⁵	4.22 x10 ⁵	3.71 x10 ⁵	7.10 x10 ⁴	7.20 x10 ⁷	1.53 x10 ⁵	+	+	+

3.1. Eficiencia de la cuantificación y causas de su fracaso

De los 103 extractos analizados (214 amplificaciones), 97 proporcionaron un resultado positivo de amplificación (198 amplificaciones positivas) lo que supone un 94% de eficiencia de cuantificación (Tabla R12).

No pudieron cuantificarse mediante este método los 6 extractos de las muestras 10SK4, SK106, SK109, 1PI, TR10 y TR13. La muestra 3NE se cuantificó tres veces. En la primera de las cuantificaciones falló la amplificación de una de las réplicas, mientras que en la segunda no se obtuvo ningún resultado positivo. De forma similar, únicamente una de las dos réplicas de la muestra 1MA12 proporcionó resultado positivo de cuantificación.

Tabla R12. Eficiencias de cuantificación por *Real Time PCR* por yacimiento, calculadas en función de los extractos (muestras) cuantificados y de las reacciones de amplificación de *Real Time PCR* llevadas a cabo.

Yacimiento	Muestras cuantificadas			Amplificaciones realizadas		
	Totales	Positivas	Eficiencia (%)	Totales	Positivas	Eficiencia (%)
Abauntz	12	12	100	24	24	100
Tres Montes	13	13	100	28	28	100
Nerja	5	5	100	16	13	81.2
El Pirulejo	2	1	50	4	2	50
Caldeirao	2	2	100	4	4	100
Toledo	1	1	100	2	2	100
Sant Pau	8	8	100	16	16	100
Tell Halula	22	22	100	44	44	100
Tell Ramad	18	16	88.9	36	32	88.9
Mari	11	11	100	22	21	95.4
Dja'de	5	5	100	10	10	100
Açikli	4	1	25	8	2	25
Total	103	97	94.2	214	198	92.5

El fallo de una reacción de amplificación puede deberse a diversas causas, tanto técnicas como relacionadas con el estado de preservación del material amplificado. Sin embargo, cuando se produce en dos réplicas de una misma muestra la segunda explicación resulta más probable. En este caso, el fracaso de la amplificación puede deberse tanto a la presencia de inhibidores de la *PCR* en el extracto como a la ausencia de DNA en el mismo.

Únicamente se dispone de resultados del “Test de inhibición” en 4 de los 8 extractos –1PI, TR13, 3NE y 1MA12– en los que falló la reacción de cuantificación en ambas réplicas. Como se señala en el apartado 4 del presente capítulo, el “Test de inhibición” muestra que los extractos de 1MA12 y PI presentan poder inhibidor a 5µl, que es precisamente la cantidad empleada en los ensayos de cuantificación. Por el contrario, las muestras TR13 y 3NE no presentan poder inhibidor a ninguna de las concentraciones ensayadas (5µl, 2.5µl y 1µl), lo que indica que en este caso la ausencia de amplificación puede estar relacionada con una escasez real de DNA *template*. El hecho de que para la muestra TR13 no pudieran obtenerse resultados positivos de amplificación de DNA mitocondrial en dos reacciones de amplificación independientes refuerza esta hipótesis. Para la muestra 3NE sí que se obtuvieron secuencias de los dos fragmentos de la HVRI del mtDNA, aunque para ello fueron necesarias 14 reacciones de amplificación.

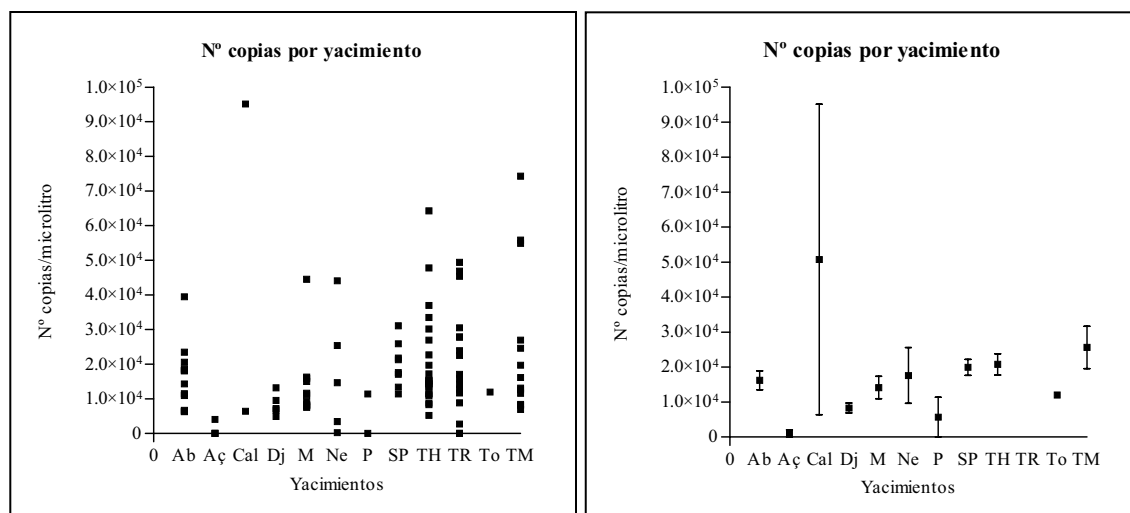
El método de cuantificación propuesto presenta una muy elevada eficiencia, aparentemente más relacionada con la tafonomía del yacimiento que con la antigüedad del mismo. En este sentido, nuestros resultados son coherentes con los de otros autores (PÄÄBO 1989; LINDAHL 1993a; MONTIEL 2001).

3.2. Resultados de cuantificación y procedencia de las muestras

Los **gráficos FR25 y FR26** muestran las medidas de cuantificación obtenidas agrupadas por yacimientos. En el primero de ellos se han representado los valores individuales obtenidos para cada una de las muestras mientras que en el segundo se ha representado la media y la desviación estándar de todas las muestras de cada yacimiento.

Los valores de cuantificación obtenidos en las muestras de cada yacimiento son, en general, bastante similares en todos los casos excepto en el yacimiento de Caldeirao, en el que una de las dos muestras analizadas –la muestra CA4– presenta un número de copias muy elevado. El análisis de las secuencias de DNA mitocondrial obtenidas a partir del extracto de CA4 muestra que muy probablemente éste fue contaminado por uno de los investigadores durante la fase de extracción (ver apartado 5.2.2.3.1. de este mismo capítulo). Ello explica que su contenido en DNA sea muy superior al obtenido en otra muestra del mismo yacimiento (CA7).

La media del número de copias de mtDNA en las muestras de los yacimientos restantes es muy similar y se sitúa en torno a 2×10^4 copias.



Gráficos FR25 y FR26. Resultados de la cuantificación de DNA expresados en número de copias por microlitro de extracto ordenados por yacimientos. Ab: Abauntz; Aç: Açikli; Cal: Caldeirao; Dj: Dja'de; M: Mari; Ne: Nerja; P: El Pirulejo; SP: Sant Pau del Camp; TH: Tell Halula; TR: Tell Ramad; To: Toledo; TM: Tres Montes.

3.3. Resultados de cuantificación y probabilidades de éxito en la obtención de información genética

Todas las secuencias que proporcionaron señal de amplificación por *Real Time PCR* salvo una presentaron un número de copias iniciales del segmento cuantificado superior a 10^4 . Ello indica que, en principio, es posible la obtención de información genética fiable a partir de las mismas. Con todo, en algunos casos no fue posible la recuperación de información genética a partir de extractos que *a priori* habían proporcionado una lectura de cuantificación óptima.

4. DETECCIÓN DE INHIBIDORES DE LA PCR

4.1. Inhibición de una PCR con “DNA fresco”

La **Tabla R13** muestra los resultados de inhibición obtenidos para cada concentración ensayada –5 μ l, 2.5 μ l y 1 μ l– en cada extracto analizado.

58 de los 112 extractos analizados muestran inhibición en al menos una de las tres concentraciones ensayadas, lo que supone un porcentaje de inhibición del 52% en las muestras analizadas.

En 38 de los 58 casos en los que se detecta inhibición se mantiene la relación entre el volumen de extracto añadido y la presencia de inhibición, es decir, cuanto menor es el volumen de extracto añadido menor es la capacidad inhibidora. En 8 (21%) de estos 38 casos la inhibición tiene lugar a las tres concentraciones ensayadas, mientras que en 12 de ellos (30.7%) ésta únicamente se manifiesta a las dos cantidades mayores (5 y 2.5 μ l), recuperándose la amplificación al añadir 1 μ l de extracto. En los 18 casos restantes (46%) únicamente aparece inhibición cuando se añade la cantidad máxima de extracto de DNA antiguo (5 μ l).

En los 20 casos restantes la relación entre el volumen de extracto añadido y el grado de inhibición no se mantiene. Ello puede deberse a errores en el pipeteo de los extractos de DNA antiguo y/o de “DNA fresco” –especialmente a volúmenes pequeños– o a la distribución no homogénea de las moléculas de inhibidor en los extractos.

La capacidad de inhibición detectada es en algunos de los casos **total** (ausencia de banda en el gel de agarosa al 2%) mientras que en otros es **parcial** (disminución de la intensidad de la banda respecto a una amplificación normal). Además, en las muestras ZA16 y TA1, se observa una alteración de la migración de las muestras en el gel de agarosa consistente en un retraso de dichas muestras respecto al frente de avance general. A modo de ejemplo, en la **Figura FR27** se muestran los resultados de inhibición de una PCR con “DNA fresco” con 8 extractos diferentes de DNA antiguo.

Tabla R13. Resultados de inhibición de diferentes extractos de DNA antiguo a tres volúmenes. -: No inhibe. +: Inhibe. P: Inhibe parcialmente.

Yacimiento	Individuo	Muestra	Inhibición			Procedencia	Individuo	Muestra	Inhibición		
			5µl	2.5µl	1µl				5µl	2.5µl	1µl
Abauntz	AB35E	AB17	-	-	+	Muge	TAS 168	TA8	+	P	-
Abauntz	AB21D	AB13	-	-	P	Nerja	NE-1829	1NE	-	-	-
Abauntz	AB29F	1AB8	+	+	-	Nerja	NE-1829	5NE	-	-	-
Abauntz	AB17C	AB14	-	-	-	Nerja	NE-NAP	4NE	-	-	+
Abauntz	AB21E	AB11	-	P	-	Nerja	NM82-2	2NE	-	-	-
Abauntz	AB23C	AB9	-	-	-	Nerja	NE-NT79	3NE	-	-	-
Abauntz	AB25E	AB20	-	-	-	Sant Pau	6 7214	1SP6	+	-	+
Abauntz	AB35F	AB15	P	-	-	Sant Pau	2 7608	SP2	-	P	+
Açikli	8a AH89	16SK2	-	-	-	Sant Pau	7 7720	1SP7	+	+	+
Açikli	8b AH89	13SK3	+	+	-	Sant Pau	7 7720	2SP7	+	-	P
Açikli	AH95 2c-2	SK107-3	-	-	-	Tell Halula	H3	TH1	-	-	-
Amir Abdallah	AA397	AA1	-	-	-	Tell Halula	H3	TH2	-	-	-
Amir Abdallah	AA418	AA12	-	-	-	Tell Halula	H4	TH3	-	+	-
Atxuri	AX-12	AT24	+	+	P	Tell Halula	H4	TH4	-	-	-
Atxuri	AX-14	AT26	-	-	-	Tell Halula	H7	TH5	-	-	-
Atxuri	AX-15	AT27	-	-	-	Tell Halula	H8	TH7	P	-	-
Caldeirao	Cal 010.107	CA7	-	-	-	Tell Halula	H8	TH8	-	-	-
Caldeirao	Q12 207	CA8	+	+	-	Tell Halula	H24	1H24	-	-	-
Caldeirão	011 77b	CA1	+	+	+	Tell Halula	H25	2H25	-	-	-
Dja'de	SK-A2	DJ1	+	-	-	Tell Halula	H26	1H26	-	-	-
Dja'de	SK-D4 16	DJ3	P	P	+	Tell Halula	H28	1H28	-	-	-
Dja'de	SK-N4	2DJ4	P	+	+	Tell Halula	H30	1H30	-	-	-
Dja'de	SK-R 3	1DJ6	+	-	+	Tell Halula	H35	1H1	-	-	-
Dja'de	SK-R 3	2DJ6	+	+	+	Tell Halula	H36	1H2	-	-	-
El Pirulejo	2PI	2PI	+	P	-	Tell Halula	H37	2H20	-	-	-
Garai	G11	GA11	+	-	-	Tell Halula	H43	2H31	-	-	-
Garai	G15	GA15	-	-	-	Tell Halula	H44	1H32	-	-	P
Garai	G16	GA16	+	-	-	Tell Halula	H47	1H18	-	-	-
Garai	G23	GA23	-	-	-	Tell Halula	H48	1H33	-	-	-
Garai	G24	GA24	+	+	+	Tell Halula	H49	1H15	-	-	-
Garai	G3	GA3	+	-	-	Tell Halula	H53	1H14	-	-	-
Garai	G50	GA50	P	P	-	Tell Halula	H54	2H34	-	-	-
Mari	1	1MA1	+	P	-	Tell Halula	H56	1H16	-	-	-
Mari	2	2MA2	+	-	-	Tell Halula	H57	1H21	P	-	-
Mari	3	1MA3	+	-	-	Tell Halula	H64	2H13	-	-	-
Mari	4	1MA4	P	-	-	Tell Halula	H65	2H10	-	-	-
Mari	4	2MA4	+	-	-	Tell Halula	H66	1H9	-	-	-
Mari	5	1MA5	+	-	-	Tell Halula	H66	2H9	-	-	-
Mari	6	1MA6	P	P	-	Tell Halula	H68	H12	-	-	-
Mari	7	1MA7	+	-	+	Tell Halula	H70	2H11	-	-	-
Mari	8	1MA8	+	-	-	Tell Halula	H70	3H11	-	-	-
Mari	10	2MA10	P	-	-	Tell Ramad	R65-1	TR7	-	-	-
Mari	11	3MA11	+	-	-	Tell Ramad	R65 C8 SEA	TR13	-	-	-
Mari	12	1MA12	P	-	-	Tell Ramad	R65-4 II	TR9	-	-	-
Muge	TAS 168	TA1	+	+	-	Tell Ramad	R65 (8)	TR4	-	-	-
Muge	TAS 214	TA2	P	P	-	Tell Ramad	R65-7 I	TR1	-	-	-
Muge	TAS 216	TA9	+	+	-	Tell Ramad	R69 (2)	TR14	-	-	-
Muge	TAS 216	TA3	+	+	+	Tell Ramad	R69 (2)	TR15	-	-	-
Muge	TAS168	TA7	P	+	-	Toledo	K-13	TO1	P	P	P

Tabla R13. (Continuación).

Procedencia	Individuo	Muestra	Inhibición		
			5ml	2.5ml	1ml
Tres Montes	TM5	2TM1	-	-	-
Tres Montes	TM3	1TM2	-	-	-
Tres Montes	TM23	1TM4	-	-	-
Tres Montes	TM23	2TM4	P	P	+
Tres Montes	TM 4B-6B	1TM5	P	-	-
Tres Montes	TM63	1TM6	-	+	-
Tres Montes	TM 3C-3D	TM7	-	-	+
Tres Montes	TM 1C-1D	TM8	+	-	+
Tres Montes	TM 1D	TM10	+	+	+
Tres Montes	TM 1C	TM11	-	-	-
Tres Montes	TM 4C-4D	TM12	+	-	+
Tres Montes	TM 4C	TM13	+	+	+
Zafarraya	ZA13	ZA13	+	-	-
Zafarraya	ZA16	ZA16	+	+	-

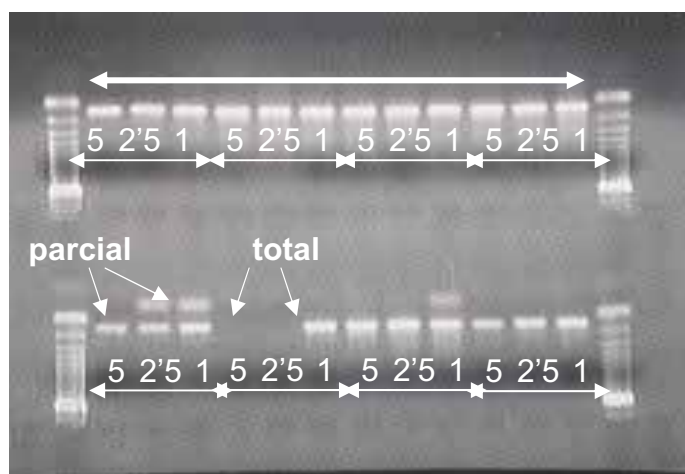


Figura FR27. Gel de agarosa al 2% que muestra los resultados de inhibición de una *PCR* de “DNA fresco” con diferentes volúmenes (5µl, 2.5µl y 1µl) de 8 extractos de DNA antiguo. La ausencia de amplificación se interpreta como presencia de inhibidores en el extracto de DNA antiguo correspondiente, mientras que la disminución de la intensidad de la banda de amplificación indica inhibición parcial.

4.1.1. Resultados de inhibición por individuo

En 12 casos se valoró la presencia de inhibidores en dos extractos diferentes de un mismo individuo: SK-R3, Mari-4, TAS216, TAS168, NE-1829, 7 7720, H4, H8, H66, H70, R69(2), TM23. En 7 casos (58.3%) se aprecia una coincidencia entre los resultados de inhibición de las dos muestras de un mismo individuo (inhiben a las mismas concentraciones), en 4 (33.3%) existen diferencias de inhibición a una concentración ensayada y únicamente en un caso (8.3%) –la muestra TM23– se aprecia un patrón de inhibición totalmente diferente entre ambos extractos.

Las diferencias de inhibición entre extractos de un mismo individuo en una de las tres cantidades ensayadas puede deberse a cualquiera de los dos factores comentados anteriormente: a una falta de homogeneidad en la distribución de las moléculas de inhibidor en el extracto o a errores en el pipeteo de pequeñas cantidades tanto de inhibidor como de “DNA fresco”. El patrón de inhibición detectado en el individuo H4 resulta más fácil de explicar considerando un error en el pipeteo del DNA fresco, que hubiera proporcionado un falso resultado positivo de inhibición. Esta observación resulta coherente con el patrón de inhibición global del yacimiento de Tell Halula. Los tres casos restantes –en los que uno de los extractos no presenta inhibición a 2.5µl (SK-R3 y 7 7720) o 1µl (TAS216)– pueden estar causados cualquiera de los dos factores o por una combinación de ambos.

El patrón de inhibición observado en los diferentes extractos está en concordancia con el patrón de inhibición global del yacimiento del que proceden, es decir, los extractos con escasa inhibición (NE-1829, H4, H8, H66, H70 y R69(2)) proceden de yacimientos con un nivel global de inhibición bajo (Nerja, Tell Halula y Tell Ramad) mientras que aquellos con un nivel moderado-alto de inhibición (SK-R3, Mari-4, TAS216, TAS168, 7 7720 y TM23) proceden de yacimientos con el mismo nivel global de inhibición (Dja'de, Mari, Muge, Sant Pau del Camp y Tres Montes). Las muestras de un mismo individuo están sujetas a los mismos procesos degradativos y por eso no es de extrañar que su patrón de inhibición coincida, puesto que parte de estas moléculas inhibidoras podrían ser subproductos de la descomposición del individuo o incluso las propias lesiones en el DNA podrían ser responsables de la inhibición

(PÄÄBO 1989; ROGAN y SALVO 1990a). Se ha propuesto también que las moléculas inhibidoras proceden del propio enterramiento y su presencia depende por tanto de las condiciones medioambientales y tafonómicas del yacimiento (HAGELBERG y CLEGG 1991; COOPER 1992; TUROSS 1994). Estas condiciones son comunes a los individuos procedentes del mismo enterramiento y resulta pues lógico suponer que actúan de la misma forma sobre todos ellos, aunque pueden existir sutiles variaciones individuales relacionadas con la situación geográfica de cada resto dentro del yacimiento y con su grado de descomposición.

4.1.2. Relación con la procedencia de las muestras

El análisis de los resultados de inhibición por yacimiento (**Tabla R14** y **Figura FR28**) revela que existe cierta relación entre la procedencia de las muestras analizadas y su contenido en moléculas inhibidoras.

Tabla R14. Número de muestras (extractos) e individuos de cada yacimiento en los que se evaluó la presencia de inhibidores de la *PCR* mediante la inhibición de una *PCR* con “DNA fresco” y porcentaje de muestras con inhibidores.

Yacimiento	Nº Individuos	Nº muestras	Muestras con Inhibidores	% Inhibición
Abauntz	8	8	5	62.5
Açikli	3	3	1	33.3
Amir Abdallah	2	2	0	0
Atxuri	3	3	1	33.3
Caldeirao	3	3	2	66.7
Dja'de	4	5	5	100
El Pirulejo	1	1	1	100
Garai	7	7	5	71.4
Mari	11	12	12	100
Muge	4	6	6	100
Nerja	4	5	1	20
Sant Pau	3	4	4	100
Tell Halula	26	31	4	12.9
Tell Ramad	6	7	0	0
Toledo	1	1	1	100
Tres Montes	11	12	8	66.7
Zafarraya	2	2	2	100
Total	99	112	58	51.78

En todos los yacimientos se detectaron muestras con inhibidores excepto en Tell Ramad y Amir Abdallah, aunque en el último caso la ausencia de inhibidores podría deberse a un efecto de muestreo.

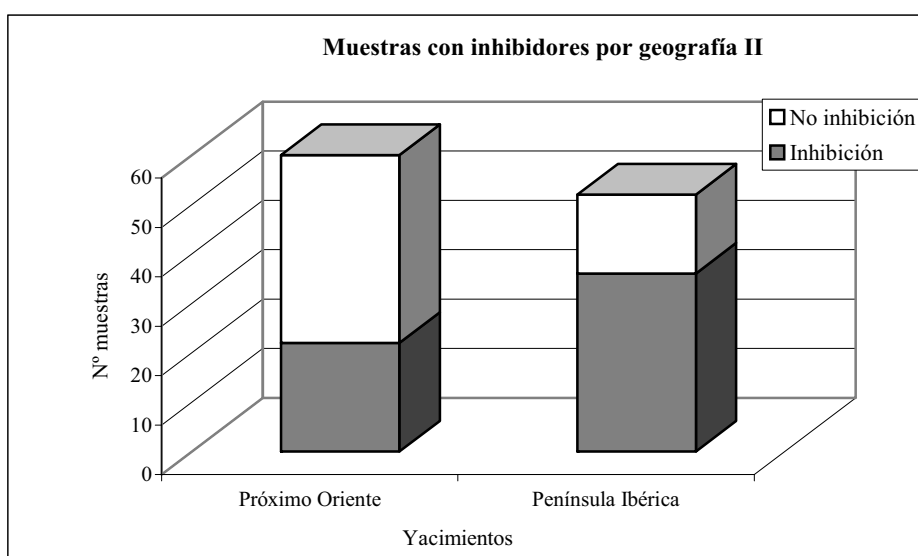
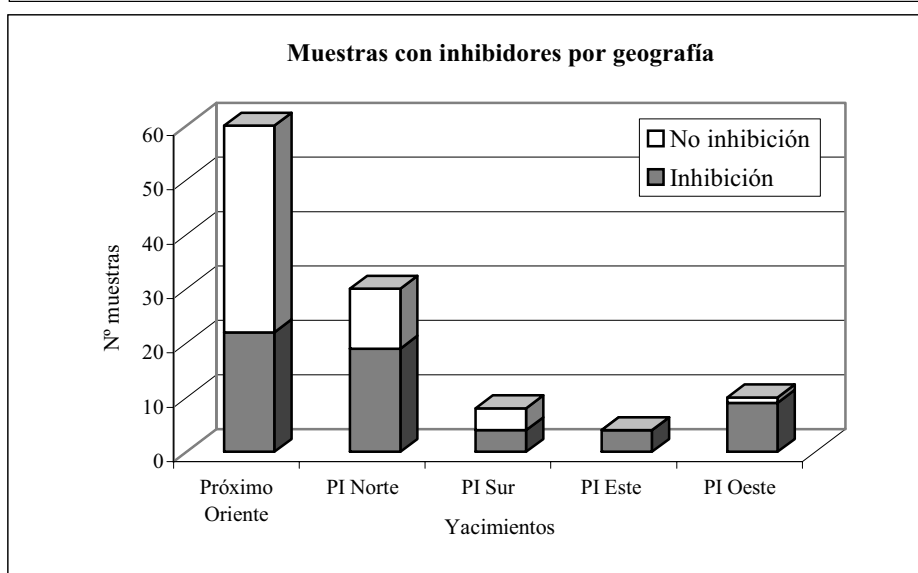
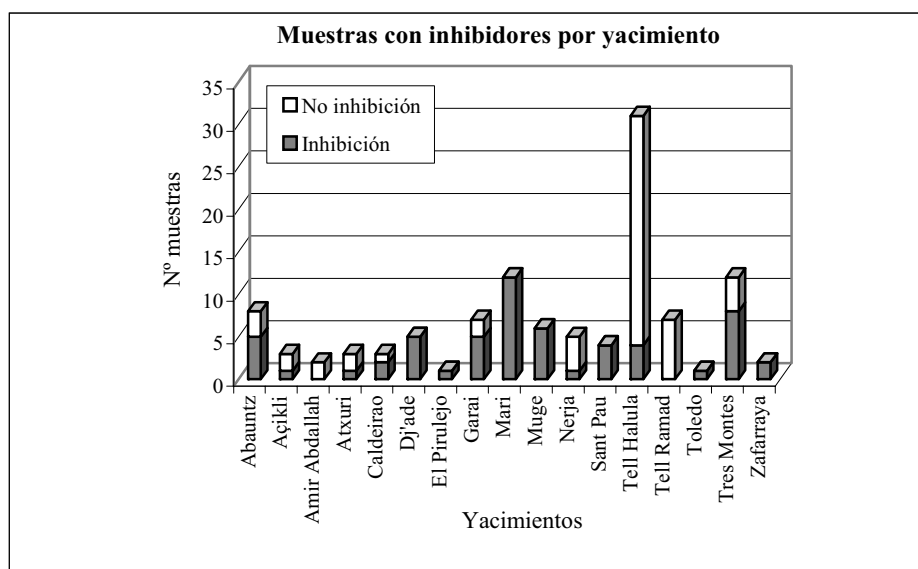
Existe una asociación estadísticamente significativa entre el yacimiento de procedencia y el número de muestras con poder inhibidor ($\chi^2=51.98$, 17 g.d.l, $P<0.0001$) una vez se han excluido aquellas categorías con un tamaño muestral inferior a 5 (Açikli, Amir Abdallah, Atxuri, Caldeirao, El Pirulejo, Sant Pau, Toledo y Zafarraya).

Los porcentajes de inhibición de los diferentes yacimientos parecen apuntar hacia la existencia de cierta relación entre la presencia de moléculas inhibidoras en los extractos y su procedencia geográfica. Por ejemplo, mientras que algunos yacimientos de Próximo Oriente (Tell Halula, Tell Ramad y Amir Abdallah) y del sur de la Península Ibérica (Nerja) presentan un bajo porcentaje de muestras con inhibidores, este porcentaje resulta muy elevado en aquellas muestras procedentes de la mitad norte de la Península Ibérica (Atxuri, Garai, Abauntz y Tres Montes).

Tabla R15. Porcentaje de muestras con inhibidores en los yacimientos agrupados en base a su geografía según dos criterios. El primero de ellos (Agrupación I) distingue entre Próximo Oriente y diferentes subconjuntos de muestras de la Península Ibérica. El segundo (Agrupación II) agrupa las muestras de Próximo Oriente por un lado y las de la Península Ibérica por otro.

Yacimientos	Localización	Agrupación I	n	% inhibición	Agrupación II	n	% inhibición
Tell Halula	Siria	Próximo Oriente	60	36.7	Próximo Oriente	60	36.7
Tell Ramad	Siria						
Dja'de Mari	Siria						
Açikli	Turquía						
Abauntz	Navarra	Península Ibérica Norte	30	63.3	Península Ibérica	52	69.23
Tres Montes	Navarra						
Atxuri	Vizcaya						
Garai	Vizcaya						
Nerja	Málaga	Península Ibérica Sur	8	50			
El Pirulejo	Córdoba						
Zafarraya	Granada	Península Ibérica Este	4	100			
Sant Pau del Camp	Barcelona						
Caldeirao	Portugal	Península Ibérica Oeste	10	90			
Muge	Portugal						
Toledo	Portugal						

Cuando se agrupan los yacimientos en 4 categorías –Próximo Oriente y Península Ibérica norte, sur, este y oeste– en base a su procedencia (**Tabla R15. Agrupación I y Figura FR29**) se comprueba que existe una asociación estadísticamente significativa entre la procedencia de las muestras y el número de muestras con inhibidores ($\chi^2=51.98$, 4 g.d.l., $P=0.0022$). Lo mismo sucede cuando se agrupan todos los yacimientos de la Península Ibérica y se comparan con los de Próximo Oriente, generándose una tabla 2×2 (χ^2 aplicando la corrección de Yates=10.83, 1 g.d.l., $P=0.0012$; prueba exacta de Fisher bilateral $P=0.0007$) (**Tabla R15. Agrupación II y Figura FR30**).



Figuras FR28, FR29 y FR30. Número de muestras con inhibidores en cada yacimiento (FR28), y en yacimientos agrupados en función de su localización geográfica (FR29 y FR30).

4.2. Espectros de absorción de luz

Se midieron los espectros de absorción de luz de los extractos de las muestras TA3, GA3 y ZA16 tal y como se describe en el apartado 2.3.2. del capítulo “Métodos”.

En el extracto de la muestra TA3 (**Figura FR31**) se aprecian claramente tres picos de absorción localizados a 270nm, 275nm y 290 nm aproximadamente. En el extracto de GA3 (**Figura FR32**) se repite el mismo patrón, aunque en este caso el primero de los picos está ligeramente desplazado hacia un máximo de absorción de 266 nm. Sin embargo, en el extracto de ZA16 (**Figura FR33**) se aprecian los picos de 270nm y 275nm pero no el de 290nm y aparece un pico adicional a 227nm no presente en las otras dos muestras analizadas.

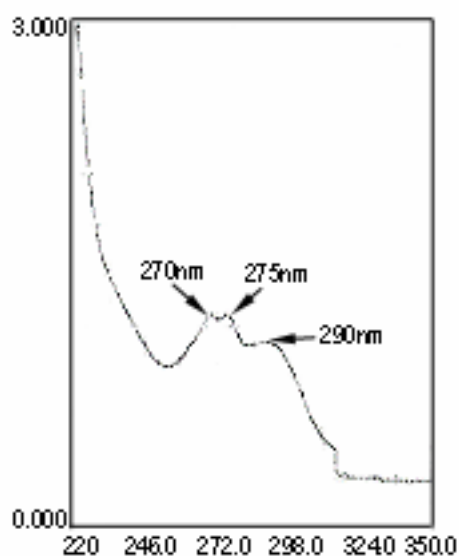


Figura FR31. Espectro de absorción de TA3.

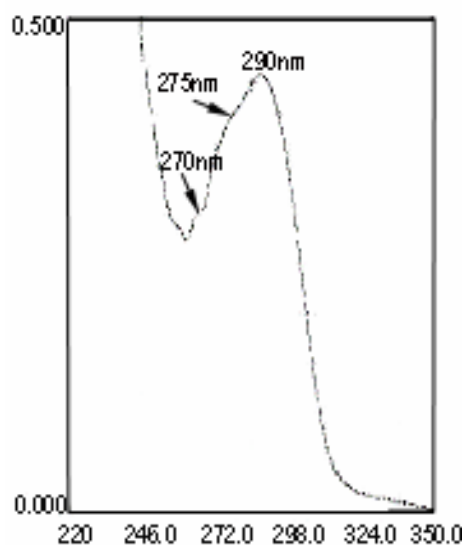


Figura FR32. Espectro de absorción de GA3.

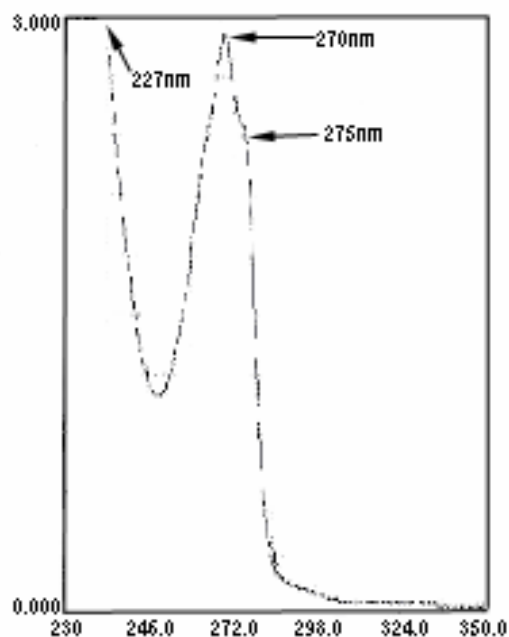


Figura FR33. Espectro de absorción de ZA16.

El pico de 270nm, presente en los tres extractos analizados, podría corresponder al DNA, cuya absorbancia está establecida en 260nm. El máximo de absorbancia observado a 275nm aparece también en extractos de DNA antiguo analizados por otros autores (MONTIEL 2001), y ha sido relacionado con la presencia de proteínas. Sin embargo, dado que el protocolo de extracción de DNA empleado en el presente trabajo elimina totalmente la fracción proteica, no cabría esperar la presencia de proteínas en el extracto final. Este pico de absorción podría corresponder por lo tanto a una sustancia inhibidora. Según MONTIEL 2001, si se almacenan los extractos de DNA antiguo en frío durante cierto tiempo y posteriormente se transfieren a otro tubo, en la pared del tubo original quedan unos residuos cuyo espectro de absorción muestra un aumento de absorción a 210nm y 240nm y unos picos invertidos o *gaps* a 488nm, 582nm y 658nm. El pico de 210nm podría corresponder al primer máximo de absorción detectado en el extracto de la muestra ZA16, que también se intuye en los otros dos extractos analizados.

Algunos de los compuestos propuestos por algunos autores como posibles inhibidores presentan un espectro de absorción conocido que puede relacionarse con los de los extractos de DNA antiguo analizados. Este es el caso de las porfirinas y algunos productos de su degradación como las metaloporfirinas, las cuales absorben en la región

de la luz visible a longitudes de onda de 550nm y 400nm (REST 1982). Otros productos resultantes de reacciones químicas endógenas –los productos de Maillard– muestran dos picos amplios de absorción alrededor de 500nm y 695nm (WONDRAK *et al.* 1995). Por otra parte, la familia de ácidos húmicos y fúlvicos presenta una zona de absorción intensa que va desde los 208nm hasta los 350nm en los primeros y hasta 400nm en los segundos (MONTIEL 2001). Los ácidos húmicos muestran cierta absorción adicional a 242nm y 280nm (MONTIEL 2001). Los máximos de absorción del grupo de las porfirinas y productos de Maillard caen fuera del intervalo de longitudes de onda analizadas para las muestras antiguas, por lo que no pueden ser comparado con los espectros obtenidos. Sin embargo, los ácidos húmicos y fúlvicos presentan picos de absorción precisamente dentro de este intervalo. El pico de 227nm que se observa en el espectro de ZA16 y se intuye en los de los otros dos extractos analizados podría pertenecer a los ácidos húmicos y/o fúlvicos. Los máximos de absorción a 270nm, 275nm y 290nm podrían corresponderse con el “hombro” de 280nm que se detecta al analizar el espectro de absorción entre 190-820nm de los ácidos húmicos (MONTIEL 2001). El análisis del espectro de absorción de estos compuestos en un rango de longitudes de onda análogo al empleado en el presente trabajo podría revelar la descomposición de este máximo de absorción a 280nm en más de un pico.

La intensidad de absorción de los picos de 270nm, 275nm y 290nm es variable en los tres extractos analizados. En la **Tabla R16** se muestran los valores de absorción corregidos por el factor de dilución aplicado en cada caso para cada muestra y para cada uno de los tres picos de absorción detectados. Se intentó relacionar el valor absoluto de cada uno de estos picos con el poder inhibidor de cada una de las muestras ordenándolas de acuerdo a su absorbancia para cada pico. El resultado reveló que no parecía existir una relación entre una mayor absorbancia del pico y un incremento en el poder inhibidor del extracto en cuestión sobre “DNA fresco”.

Tabla R16. Valores de absorbancia a tres longitudes de onda de los extractos analizados corregidos por el factor de dilución aplicado en cada caso.

Muestra	Factor dilución	Absorbancia		
		270nm	275nm	290nm
GA3	7	21.7	28	30.1
ZA16	19	45.6	41.8	1.9
TA3	4.6	19.32	19.32	17.48

5. POLIMORFISMOS DE DNA MITOCONDRIAL

5.1. Amplificación, reamplificación y secuenciación de la región control del mtDNA

5.1.1. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación

Se estimaron las eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación sobre el número total de intentos de amplificación realizados en cada caso, de acuerdo con lo descrito en el apartado 15.1.1. del capítulo “Métodos”,

De las 763 reacciones de amplificación en las que se visualizó el resultado en un gel de electroforesis y cuyos blancos de amplificación no se contaminaron, 135 proporcionaron resultado positivo de amplificación, lo que supone un **17.69% de eficiencia de amplificación**. Este resultado, sin embargo, pudiera estar subestimado debido a que 590 de las amplificaciones realizadas se reamplificaron directamente sin visualizar previamente su resultado en un gel de agarosa.

La **eficiencia de la reamplificación** es sensiblemente superior: de 633 reacciones 264 dieron resultado positivo, sin contar tampoco aquellas procedentes de grupos de amplificación y reamplificación contaminados, lo que supone una eficiencia global del **41.7%**. Este valor de eficiencia tan bajo se debe a que un porcentaje importante de las alícuotas procedentes de la primera amplificación fueron reamplificadas directamente sin visualizar su resultado. Únicamente un 10.7% de estas reacciones proporcionaron resultado positivo de reamplificación. Por el contrario el 83% de las alícuotas con resultado positivo en la primera amplificación fueron reamplificadas con éxito. Estos resultados sugieren que para que la reamplificación funcione es necesario que la primera reacción de amplificación haya producido una cantidad mínima de DNA *template* y que probablemente la mayoría de las alícuotas reamplificadas directamente no habían proporcionado banda de amplificación en la primera *PCR*. El fracaso de la reamplificación de aquellas alícuotas de amplificación positiva puede deberse a que la señal de amplificación corresponda a artefactos de *PCR* o bandas inespecíficas.

La **eficiencia global de secuenciación** –entendida como la capacidad de obtener secuencias legibles– se sitúa en torno al **60%**. Esta eficiencia depende esencialmente de la “calidad” y cantidad del DNA *template* y de ciertos parámetros de la reacción de secuenciación, tales como la composición del *kit* de secuencia, un diseño óptimo de los cebadores o el programa de amplificación empleado (APPLIED BIOSYSTEMS 2000). La “calidad” del DNA *template* de la reacción de secuencia es independiente del estado de preservación del DNA del extracto inicial, puesto que en este caso se trata de un material que ya ha sido seleccionado y copiado mediante *PCR*. Dicha calidad tiene que ver más con su pureza, determinada por la ausencia en el extracto de DNA purificado de otras sustancias –componentes de *PCR* (dNTPs, *Taq*, sales...), restos de agarosa, etc–. La eficiencia de eliminación de los terminadores de reacción tras la *PCR* de secuencia resulta también determinante para una correcta secuenciación. En la **Tabla R17** se resumen las eficiencias de las reacciones de amplificación, reamplificación y secuenciación en el conjunto de muestras estudiadas en la presente tesis doctoral.

Tabla R17. Eficiencias globales de amplificación, reamplificación y secuenciación de las muestras estudiadas, calculadas como el cociente entre el número de resultados positivos y el número de ensayos realizados.

	Total	Positivas	Eficiencia (%)
Amplificación	763	135	17.69
Reamplificación	633	264	41.7
Secuenciación	773	443	57.3

La eficiencia de estas reacciones está condicionada por diversos factores. A continuación se presenta el análisis de la influencia que tienen sobre estas eficiencias ciertas variables como el tipo de diente o tejido de partida, el tipo de cebador, el tamaño del fragmento amplificado, el tipo de polimerasa empleada, la procedencia de la muestra o su antigüedad. Para el cálculo de las diferentes eficiencias únicamente se tuvieron en cuenta aquellas alícuotas procedentes de grupos de amplificación y reamplificación no contaminados y de las que se conocía su resultado final de amplificación. En la sección 15.1. del capítulo “Métodos” se describe el procedimiento desarrollado para el cálculo de dichas eficiencias y las pruebas estadísticas empleadas en su comparación.

5.1.1.1. Tipo de tejido

En la presente tesis doctoral se extrajo DNA a partir de dos tipos de tejidos: hueso y diente. En la **Tabla R18** se desglosan las eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación para ambos tejidos.

Tabla R18. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por tejido.

Tejido	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
Diente	717	126	17.57	542	234	43.17	679	396	58.32
Hueso	27	6	22.2	34	14	41.17	26	26	100
Total	744	132	17.74	576	248	43.05	705	422	59.85

Las eficiencias de amplificación y reamplificación de los dos tejidos son muy similares entre sí y no se aprecian diferencias significativas entre ellos (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P=0.61$ y $P=0.86$). Sin embargo, sí que existen diferencias significativas entre ellos en la eficiencia de la reacción de secuencia (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P<0.0001$), siendo ésta del 100% en muestras de hueso.

5.1.1.2. Tipo de pieza dental

La mayor parte de las extracciones de DNA –aproximadamente un 96%– se realizaron a partir de piezas dentarias puesto que los dientes constituyen un depósito natural de material genético especialmente resistente a la degradación orgánica (DeGUSTA *et al.* 1994). Por ello puede resultar de interés el análisis de las eficiencias de las reacciones de amplificación, reamplificación y secuenciación entre diferentes tipos de estas piezas.

En la **Tabla R19** se muestran las eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación en piezas dentarias definitivas, deciduales, gérmenes y raíces. Únicamente se detectan diferencias significativas entre estos tipos dentarios para la reacción de amplificación ($\chi^2=59.83$; 2 g.d.l.; $P<0.0001$), pero no para la reamplificación ($\chi^2=0.86$; 2 g.d.l.; $P=0.65$) ni la secuenciación ($\chi^2=5.1$; 2 g.d.l.; $P=0.08$). En la reacción de amplificación no existen diferencias significativas entre las piezas deciduales y las definitivas (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P=0.095$), pero sí

entre cada una de ellas separadamente y los gérmenes (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P_{\text{decidual-gérmen}}=0.0007$ y $P_{\text{definitivo-gérmen}}<0.0001$). Ello indica que únicamente existe una desventaja en la amplificación cuando se emplean piezas no emergidas. La variable raíz no fue comparada debido al reducido número de muestras estudiadas de este tipo.

Tabla R19. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por tipo de pieza dental (decidual, definitiva, germen o raíz). -: Reacciones cuyo resultado de amplificación no fue visualizado en un gel de agarosa. Aquellas clases significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de las restantes se marcan con un asterisco.

Tipo pieza	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
Decidual	66	17	25.75	40	15	37.50	23	48	47.91
Definitivo	600	104	17.33	466	210	45.06	349	605	57.68
Germen	51	5	9.80*	11	5	45.45	10	12	83.33
Raíz	-	-	-	5	1	20	2	2	100
Total	717	126	17.57	522	231	44.25	384	667	57.57

Cuando se comparan los cuatro tipos de piezas dentarias empleadas en la extracción (**Tabla R20**), no se detectan diferencias significativas en las eficiencias de amplificación ($\chi^2=2.58$; 3 g.d.l.; $P=0.46$) y secuenciación ($\chi^2=7.7$; 3 g.d.l.; $P=0.052$), pero sí en la de reamplificación ($\chi^2=19.39$; 3 g.d.l.; $P=0.0002$). La diferencia viene definida por los caninos (C), que exhiben una eficiencia de reamplificación mayor y significativamente diferente a los tres tipos restantes (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P<0.0001$). No se detectan diferencias significativas entre los incisivos (I), los molares (M) y los premolares (P) ($\chi^2=2.54$; 2 g.d.l.; $P=0.28$).

Tabla R20. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por tipo de pieza dental. I: Incisivo; C: Canino; P: Premolar; M: Molar. Aquellas clases significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de las restantes se marcan con un asterisco.

Tipo pieza	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
I	146	27	18.49	92	37	40.21	99	65	65.65
C	158	34	21.51	59	41	69.49*	116	72	62.06
P	135	22	16.29	77	38	49.35	102	63	61.76
M	274	43	15.69	287	113	39.37	349	184	52.72
Total	713	126	17.67	515	229	44.46	706	384	54.39

Clasificando las piezas dentales en ocho tipos (**Tabla R21**) se detectan diferencias significativas en las eficiencias de reamplificación ($\chi^2=31.39$; 6 g.d.l; $P<0.0001$) y secuenciación ($\chi^2=39.28$; 6 g.d.l; $P<0.0001$) pero no en la eficiencia de amplificación ($\chi^2=6$; 6 g.d.l; $P<0.0001$) una vez excluidas las clases con valores inferiores a 5 (P2 y M2 de amplificación, P1 de reamplificación y secuenciación). No existen diferencias significativas en ninguna de las tres eficiencias entre los dos tipos de incisivos (Prueba de Fisher bilateral; P amplificación=0.37; P reamplificación=1.00 ; P secuenciación=0.15). Sin embargo, sí que existen diferencias entre los tres tipos de molares para la reamplificación ($\chi^2=8.25$; 2 g.d.l; $P=0.016$) y la secuenciación ($\chi^2=24.23$; 2 g.d.l; $P<0.0001$). La existencia de clases inferiores a 5 impide realizar una comparación estadística para cada eficiencia entre los dos tipos de premolares y entre las eficiencias de amplificación de los tres tipos de molares.

En general, el segundo molar presenta unas eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación inferiores a la de las otras piezas analizadas. De hecho, si observamos la **Tabla R21**, los molares presentan las eficiencias más bajas del conjunto, observación que coincide con la del estudio de MONTIEL 2001.

Tabla R21. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por tipo de pieza dental. I1: Incisivo central; I2: Incisivo lateral; C: Canino; P1: Primer premolar; P2: Segundo premolar; M1: Primer molar; M2: Segundo molar; M3: Tercer molar. Aquellas clases significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) de las restantes se marcan con un asterisco.

Tipo pieza 2	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
I1	44	6	13.64	15	9	60	24	11	45.83
I2	35	8	22.86	20	11	55	32	8	25
C	158	34	21.52	59	41	69.49	116	72	62.07
P1	22	5	22.73	10	7	70	17	14	82.35
P2	23	4	17.39	39	15	38.46	40	22	55
M1	98	11	11.22	26	12	46.15	33	24	72.73
M2	55	4	7.27	119	34	28.57	86	34	39.53
M3	28	6	21.43	23	13	56.52	52	41	78.85
Total	463	78	16.85	311	142	45.66	400	226	56.5

5.1.1.3. Longitud del segmento amplificado – Tipo de cebador

En la **Tabla R22** se presentan las eficiencias obtenidas con cada uno de los cebadores empleados. Existen diferencias significativas entre las eficiencias de reamplificación ($\chi^2=67.63$; 3 g.d.l.; $P<0.0001$) y secuenciación ($\chi^2=208.5$; 3 g.d.l.; $P<0.0001$) cuando se consideran las cuatro parejas de cebadores empleadas. Aunque los datos de amplificación no cumplen las condiciones necesarias para la prueba de χ^2 , puede observarse que los cebadores L16154-H16400/L16158-H16394 y L16252-H16400/L16283-H16394 no proporcionaron ningún resultado positivo de amplificación, lo que viene a sugerir que su empleo no resulta adecuado para el estudio de muestras como las de la presente tesis doctoral.

Tabla R22. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por tipo de cebador. e: pareja de cebadores externos. i: pareja de cebadores internos. L16112-H16262 y L16125-H16259: Primer segmento, (presente tesis doctoral); L16251-H16380 y L16257-H16370: Segundo segmento (presente tesis doctoral); L16154-H16400 y L16158-H16394: Segmento largo (GARCÍA-BOUR *et al.* 2004); L16252-H16400 y L16283-H16394: Segmento corto (GARCÍA-BOUR *et al.* 2004).

	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
L16112-H16262-e									
L16125- H16259-i	438	67	15.3	157	89	56.69	279	191	68.46
L16251-H16380-e									
L16257- H16370-i	288	68	23.61	169	89	52.66	267	209	78.28
L16154-H16400-e									
L16158- H16394-i	13	0	0	115	13	11.3	17	12	70.59
L16252-H16400-e									
L16283- H16394-i	24	0	0	190	73	38.42	204	32	15.69
Total	763	135	17.69	632	264	41.77	767	444	57.89

En la **Tabla R23** se han agrupado los mismos resultados de eficiencia en base al tipo de diseño de amplificación utilizado. Las dos primeras filas de la tabla anterior corresponden al diseño empleado para el análisis de la mayor parte de las muestras del presente trabajo, mientras que las dos últimas corresponden al de GARCÍA-BOUR *et al.* 2004 –pensado originalmente para el estudio de muestras antiguas de Tierra del Fuego– utilizado al inicio de la tesis.

El diseño de GARCÍA-BOUR *et al.* 2004 no proporcionó ningún resultado positivo de amplificación. Para las reacciones de reamplificación y secuenciación existen también diferencias significativas entre ambos tipos de diseño, siendo la

eficiencia del primero de ellos muy superior a la del segundo (Prueba de Fisher bilateral; P reamplificación <0.0001 ; P secuenciación <0.0001).

Tabla R23. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por tipo de diseño de amplificación.

	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
Presente tesis doctoral	726	135	18.60	327	178	54.43	546	400	73.26
García-Bour <i>et al.</i> 2004	37	0	0	305	86	28.20	221	44	19.91
Total	763	135	17.69	632	264	41.77	767	444	57.89

El tamaño del fragmento amplificado es uno de los factores limitantes en los estudios de DNA antiguo. En la presente tesis doctoral se realizaron amplificaciones de dos longitudes diferentes: aproximadamente de 300pb con los cebadores L16154-H16400/L16158-H16394 y L16112-H16380/L16125-H16370 y de 150pb con los cebadores L16252-H16400/L16283-H16394, L16112-H16262/L16125-H16259 y L16251-H16380/L16257-H16370. En la **Tabla R24** se muestran las eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación calculadas en función del tamaño de fragmento amplificado.

Tabla R24. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por tamaño del fragmento amplificado.

Tamaño	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivos	Eficiencia (%)	Total	Positivos	Eficiencia (%)	Total	Positivos	Eficiencia (%)
300pb	13	0	0	116	13	11.21	17	12	70.59
150pb	750	135	18	516	251	48.64	750	432	57.6
Total	763	135	17.69	632	264	41.77	767	444	57.89

De nuevo, la ausencia de resultados positivos de amplificación en una de las clases –la correspondiente al fragmento de mayor tamaño– impide llevar a cabo cualquier test estadístico de comparación, sin embargo queda claro que el fragmento de 300pb plantea más problemas que el de 150pb. Para la eficiencia de reamplificación se aprecian diferencias significativas entre ambos tamaños de amplicón (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P < 0.0001$), siendo mucho mayor –como era de esperar– la del fragmento pequeño. El tamaño de fragmento parece no influir en la eficiencia de la reacción de secuencia, para la que no se detectan diferencias significativas (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P = 0.33$). Este resultado y el de la tabla anterior sugieren que

la eficiencia de la reacción de secuencia depende más del tipo de cebador empleado que del tamaño del amplicón. Una vez se ha conseguido la amplificación y reamplificación de un fragmento su longitud deja de ser un factor limitante.

5.1.1.4. Tipo de polimerasa

En la presente tesis doctoral se emplearon polimerasas de tres casas comerciales cuya formulación se describe con detalle en el apartado 9.2.2.2. del capítulo “Métodos”. En la **Tabla R25** se detallan las eficiencias de cada una de estas *Taq*-polimerasas.

Únicamente se obtuvieron resultados positivos de amplificación con la polimerasa de Biotools® y la *Taq-expand High Fidelity* de Roche®, aunque no existen diferencias significativas entre ellas (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P=0.27$). En la reamplificación, la enzima de Biotools® presenta una eficiencia del 100%, que contrasta especialmente con la baja eficiencia de la polimerasa de GIBCO-BRL. Para esta reacción la ausencia de resultados negativos de reamplificación con la polimerasa de Biotools® impide su comparación con las otras dos mediante un test de χ^2 , aunque sí que puede probarse la existencia de diferencias entre las otras dos polimerasas (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P<0.0001$). Existen también diferencias significativas entre los tres tipos de polimerasa en la eficiencia de secuenciación ($\chi^2=107.4$; 2 g.d.l.; $P<0.0001$), aunque la reacción de secuencia se lleva a cabo con el enzima que incorpora el tampón de secuencia.

Los resultados indican que la *Taq* de GIBCO-BRL® presenta un rendimiento general mucho menor que las otras dos polimerasas, sin embargo este resultado debe ser acogido con cautela puesto que esta polimerasa fue empleada al inicio de la presente tesis doctoral, cuando aún no se disponía de un entrenamiento adecuado en las técnicas de DNA antiguo. Esta polimerasa se utilizó conjuntamente con el diseño de cebadores de GARCÍA-BOUR *et al.* 2004 que, como se ha demostrado anteriormente, proporciona unas menores eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación.

Las mayores eficiencias corresponden a la polimerasa de Biotools®. Sin embargo, el porcentaje de amplificaciones realizadas con esta enzima que resultaron

contaminadas es casi el doble que el de las amplificaciones en las que se empleó la *Taq expand* (41% vs 22%).

Tabla R25. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por tipo de polimerasa empleada en las reacciones de amplificación y reamplificación.

Tipo polimerasa	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
Biotoools	52	13	25	16	16	100	19	13	68.42
GIBCO-BRL	53	0	0	325	94	28.92	302	104	34.44
Taq-expand	658	122	18.54	292	154	52.74	452	327	72.35
Total	763	135	17.69	633	264	41.71	773	444	57.44

5.1.1.5. Procedencia

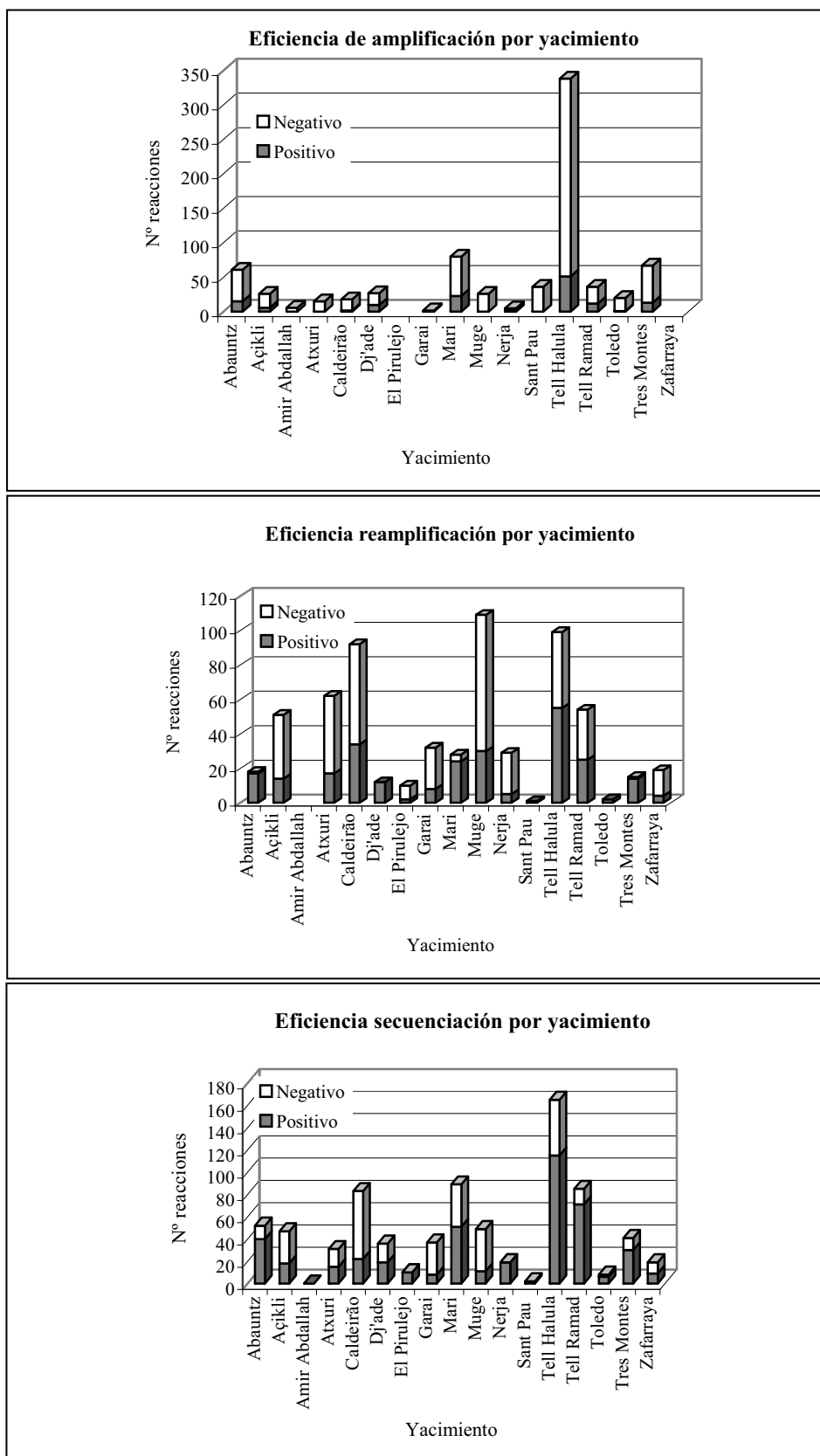
La **Tabla R26** y las **Figuras FR34, FR35 y FR36** muestran las eficiencias de las reacciones de amplificación, reamplificación y secuenciación de las muestras de cada yacimiento arqueológico.

Tabla R26. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por yacimiento arqueológico.

Yacimiento	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivos	Eficiencia (%)	Total	Positivos	Eficiencia (%)	Total	Positivos	Eficiencia (%)
Abauntz	61	15	24.59	18	17	94.44	52	32	76.92
Açikli	26	6	23.08	51	14	27.45	47	20	38.30
Amir Abdallah	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Atxuri	15	0	0	62	17	27.42	31	17	48.39
Caldeirão	18	2	11.11	92	34	36.96	83	36	26.51
Dja'de	27	10	37.04	12	12	100	36	22	52.78
El Pirulejo	0	0	0	10	2	20	10	2	100
Garai	2	0	0	32	8	25	37	8	21.62
Mari	80	23	28.75	28	24	85.71	89	47	57.30
Muge	26	0	0	109	30	27.52	49	30	22.45
Nerja	5	2	40	29	5	17.24	19	7	100
Sant Pau	36	0	0	1	1	100	2	1	0
Tell Halula	432	51	11.81	99	55	55.56	165	106	69.70
Tell Ramad	45	12	26.67	54	25	46.30	85	37	83.53
Toledo	15	1	6.67	2	2	100	8	3	75
Tres Montes	76	13	17.11	15	14	93.33	41	27	73.17
Zafarraya	0	0	0	19	4	21.05	19	4	47.37
Total	763	135	17.69	633	264	41.71	773	399	57.44

Como puede apreciarse, para algunos yacimientos –Amir Abdallah, Atxuri, El Pirulejo, Garai, Muge, Sant Pau del Camp o Zafarraya– no se obtuvo ningún resultado positivo de amplificación. Estos resultados pudieran estar infraestimados puesto que en algunos casos las reacciones de amplificación no se visualizaron en un gel de agarosa y se reamplificaron directamente.

Existe una gran diferencia en el número de alícuotas analizadas en cada yacimiento, lo que dificulta en parte el análisis estadístico. Esta diferencia viene determinada por el número de muestras estudiadas de cada yacimiento y por el número de intentos totales de cada uno de los tres tipos de reacción. Existen diferencias significativas entre las eficiencias de amplificación de aquellos yacimientos que cumplen los requisitos necesarios para la aplicación del Test de la χ^2 (Abauntz, Açikli, Dja'de, Mari, Tell Halula, Tell Ramad y Tres Montes; $\chi^2=29.29$; 6 g.d.l; $P<0.0001$). Lo mismo sucede con las eficiencias de reamplificación (Açikli, Atxuri, Caldeirao, Garai, Muge, Nerja, Tell Halula y Tell Ramad; $\chi^2=32.18$; 7 g.d.l; $P<0.0001$) y secuenciación (Abauntz, Açikli, Atxuri, Caldeirao, Dja'de, Garai, Mari, Muge, Nerja, Tell Halula, Tell Ramad y Tres Montes) ($\chi^2=36.76$; 11 g.d.l; $P<0.0001$). Aunque no se pudieron comparar las eficiencias de ninguna de las tres reacciones entre todos los yacimientos estudiados, los resultados obtenidos sugieren que existe una fuerte asociación entre la procedencia de las muestras y el éxito en la obtención de información genética a partir de las mismas.



Figuras FR34, FR35 y FR36. Resultados positivos y negativos de amplificación (FR34), reamplificación (FR35) y secuenciación (FR36).

En el apartado de inhibición de este capítulo se demuestra que la presencia de inhibidores en los extractos de DNA antiguo está relacionada con la procedencia geográfica de la muestra. Para tratar de ver si ésta condiciona también la eficiencia de la recuperación de información genética se agruparon los resultados en cinco categorías atendiendo a su procedencia geográfica:

- Próximo Oriente: Açikli, Amir Abdallah, Dja'de, Mari, Tell Halula y Tell Ramad
- Península Ibérica Norte: Abauntz, Atxuri, Garai, Tres Montes
- Península Ibérica Sur: Nerja, El Pirulejo, Zafarraya
- Península Ibérica Este: Sant Pau del Camp
- Península Ibérica Oeste: Caldeirao, Muge, Toledo

y se calcularon sus respectivas eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación (**Tabla R27**).

Tabla R27. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por localización geográfica de las muestras.

	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
Próximo Oriente	610	102	16.72	244	130	53.28	422	232	54.98
Península Ibérica Norte	154	28	18.18	127	56	44.09	161	84	52.17
Península Ibérica Sur	5	2	40	58	11	18.97	48	13	27.08
Península Ibérica Oeste	59	3	5.08	203	66	32.51	140	69	49.29
Península Ibérica Este	36	0	0	1	1	100	2	0	0
Total	864	135	15.63	633	264	41.71	773	398	51.49

La presencia de valores iguales a 0 y menores de 5 impiden comprobar estadísticamente si existen o no diferencias significativas entre las eficiencias de amplificación de las cinco clases, sin embargo sí puede demostrarse una asociación estadísticamente significativa entre la procedencia de las muestras y las eficiencias de reamplificación ($\chi^2=33.15$; 3 g.d.l.; $P<0.0001$) y secuenciación ($\chi^2=13.8$; 3 g.d.l.; $P=0.0032$) de las clases “Próximo Oriente”, “Península Ibérica Norte”, “Península Ibérica Sur” y “Península Ibérica Oeste”.

Cuando se agrupan todos los yacimientos de la Península Ibérica y se comparan con los de Próximo Oriente (**Tabla R28**) no se detectan diferencias significativas en la eficiencia de amplificación (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P=0.1822$) pero sí en las

de reamplificación (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P < 0.0001$) y secuenciación (Prueba exacta de Fisher bilateral; $P = 0.036$).

Tabla R28. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por localización geográfica de las muestras.

	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
Península Ibérica	254	33	12.99	389	134	34.45	351	166	47.29
Próximo Oriente	610	102	16.72	244	130	53.28	422	232	54.98
Total	864	135	15.63	633	264	41.71	773	398	51.49

A pesar de su mayor antigüedad, en términos generales, las muestras de Próximo Oriente presentan unas eficiencias mayores que las de la Península Ibérica, lo que sugiere que las condiciones tafonómicas han sido allí más favorables a la preservación del material genético de los restos, con menor presencia de moléculas inhibidoras de la *PCR*. En el ámbito de la Península Ibérica, las condiciones medioambientales del Sur son igualmente más favorables que las del resto del territorio.

5.1.1.6. Antigüedad y preservación

Para tratar de evaluar la influencia de la antigüedad de las muestras en las eficacias de amplificación, reamplificación y secuenciación, se agruparon éstas cronológicamente en 7 categorías (**Tabla R29**). Las categorías se detallan en la **Tabla ME34** del apartado 15.1.1 del capítulo “Métodos”.

Tabla R29. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación por antigüedad de las muestras.

	Amplificación			Reamplificación			Secuenciación		
	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)	Total	Positivo	Eficiencia (%)
Calcolítico-Bronce	228	53	23.25	116	74	63.79	220	143	65
Medieval	2	0	0	20	8	40	37	8	21.62
Meroítico	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Neolítico 1	427	79	18.5	246	106	43.09	333	223	66.97
Neolítico 2	100	3	3	111	68	61.26	146	43	29.45
Paleolítico 1	0	0	0	7	2	28.57	4	3	75
Paleolítico 2	0	0	0	39	6	15.38	33	24	72.73
Total general	763	135	17.69	539	264	48.98	773	444	57.44

El período Meroítico no fue incluido en el análisis estadístico al no haberse podido amplificar ninguna muestra del yacimiento de Amir Abdallah. Ya se ha comentado anteriormente que el fracaso de la amplificación en este yacimiento puede deberse a la escasa preservación del material genético.

Dado el bajo número de alícuotas para las que se visualizó el resultado de amplificación de las muestras de los períodos Medieval, Paleolítico 1 y Paleolítico 2, y las escasas amplificaciones positivas obtenidas en las muestras del período Neolítico 2, no puede procederse a la comparación de las eficiencias de amplificación de los diferentes períodos. Aparecen diferencias significativas en las eficiencias de reamplificación ($\chi^2=38.54$; 4 g.d.l; $P<0.0001$) y secuenciación ($\chi^2=86.81$; 4 g.d.l; $P<0.0001$) de los diferentes grupos de edad excluyendo Paleolítico 1 por presentar valores inferiores a 5.

5.2. Secuencias de la Región Control del mtDNA

5.2.1. Secuencias obtenidas

Se han obtenido un total de 154 secuencias correspondientes a 90 muestras de 84 individuos distintos. De éstas, 69 correspondían al primer segmento de 133pb legibles y 75 al segundo segmento de 112pb. Las 10 restantes fueron obtenidas al inicio de la tesis doctoral empleando los cebadores descritos en GARCÍA-BOUR *et al.* 2004, que proporcionaban un fragmento largo de 235pb legibles (6 secuencias) y uno corto, de 110pb legibles (4 secuencias).

A partir de los dos segmentos parciales (1 y 2) pudieron reconstruirse secuencias de 249pb en un total de 42 muestras correspondientes a 39 individuos diferentes.

Estas secuencias se resumen en la **Tabla R30**.

Tabla R30. Secuencias de la región Hipervariable I del DNA mitocondrial obtenidas. Se señala entre paréntesis el número de amplificación en aquellos casos en los que se realizaron amplificaciones independientes de una misma muestra con resultado consistente. Únicamente se representan aquellas posiciones variables en el conjunto. El punto (·) indica identidad con la secuencia de referencia o *CRS* (ANDERSON *et al.* 1981). Los cambios respecto a ésta se indican con la inicial de la base nitrogenada correspondiente y en las posiciones con doble nucleótido según la nomenclatura de la IUPAC: C ó T; W: A ó T; M: A ó C; R: A ó G y S: G ó C. Aquellas posiciones para las que existe información de ambas cadenas de DNA aparecen marcadas en negrita.

Procedencia	Individuo	Muestra	1 6																									
			<i>CRS</i>	T	G	C	G	C	T	A	A	C	C	T	C	C	A	C	C	T	A	T	C	C	C	C	C	C
Abauntz	ABb1.1	AB5	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB23C	AB9	C	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB21D	AB13	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB17C	AB14	·	R	·	·	Y	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	T	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB35F	AB15	·	R	Y	·	·	Y	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB35E	AB17(1)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB35E	AB17(2)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB25E	AB20	·	·	·	·	·	·	·	·	·	G	·	·	R	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Açikli	8a AH89	16SK2	C	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Açikli	AH 95 2e-1	SK106	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Açikli	AH 95 2e-2	SK107-3	Y	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Açikli	AH 95 2e-2	SK107-4	Y	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	AX-3	AT15	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	AX-4	AT16	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	AX-13	AT25	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	AX-6	AT18	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	AX-7	AT19	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	AX-15	AT27	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Caldeirao	R12 sc 71	CA3	C	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Caldeirao	012 194	CA4	C	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Caldeirao	Cal 010.107	CA7	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Dja'de	SK-D4 16	DJ3	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Dja'de	SK-D4 16	DJ3(2)	·	A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Dja'de	SK-N4	1DJ4	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Dja'de	SK-R3	1DJ6	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·

[illegible]

Tabla R30 . (Continuación).

[illegible]

[illegible]

5.2.2. Criterios de autenticidad

En la verificación de la autenticidad de las secuencias obtenidas se emplearon los criterios descritos en el apartado 14 del capítulo “Métodos”.

5.2.2.1. Blancos de extracción y amplificación

5.2.2.1.1. Blancos de extracción

5.2.2.1.1.1. Amplificación junto con las muestras

La mayor parte de los controles de extracción fueron amplificados junto con las muestras de su mismo grupo de extracción. En la **Tabla R31** se relaciona el número de alícuotas amplificadas y reamplificadas de cada control, así como el resultado obtenido en cada caso. En dos casos (CE7 y CE8) las muestras se reamplificaron directamente sin observar el resultado de la 1ª *PCR*.

En los casos en se visualizó el resultado de la primera *PCR* (muestras CE6, CE7, CE12 y CE13) apareció banda de contaminación en tan sólo 4 de los 16 controles de extracción amplificados. Dos de los 4 controles contaminados (CE12 y CE13) produjeron resultados positivos y negativos de contaminación, respectivamente, en diferentes *PCRs*.

Trece de los controles fueron reamplificados por lo menos una vez. De ellos, en 5 casos (CE1, CE3, CE4, CE5 y CE24,) todas las reamplificaciones mostraron banda de amplificación en el agua, por lo que no pudo determinarse si la contaminación procedía de la extracción o de la *PCR*. En un caso no se detectó banda de contaminación en la reamplificación (CE23). Cinco casos mostraron una contaminación clara (CE2, CE7, CE11, CE12 y CE13), y dos proporcionaron resultados contradictorios en diferentes *PCRs* (CE6 y CE8).

Tabla R31. Número de amplificaciones y reamplificaciones (Nº) y resultados de amplificación de los 24 controles de extracción introducidos en la presente tesis doctoral. ?: muestras reamplificadas directamente sin mirar el resultado de la amplificación; -: amplificación negativa (ausencia de contaminación durante la extracción), C- cont: amplificación del control de amplificación; +: amplificación positiva (contaminación durante la extracción).

Grupo extracción	Control extracción	Amplificaciones					Reamplificaciones			
		Nº	Resultado				Nº	Resultado		
			?	-	C- cont	+		-	C- cont	+
1	CE1	13	5	7	1	0	13	0	12	1
2	CE2	8	7	1	0	0	8	0	7	1
3	CE3	3	2	1	0	0	3	0	3	0
3	CE4	3	2	1	0	0	3	0	3	0
3	CE5	3	2	1	0	0	3	0	3	0
4	CE6	11	9	0	0	2	9	3	3	3
5	CE7	8	8	0	0	0	8	0	7	1
6	CE8	4	4	0	0	0	4	1	1	2
7	CE9									
8	CE11	3	0	0	2	1	1	0	0	1
9	CE12	3	0	1	0	2	1	0	0	1
10	CE13	3	0	2	0	1	1	0	0	1
11	CE14	2	0	1	1	0				
12	CE15	2	0	1	1	0				
13	CE16	1	0	1	0	0				
14	CE17	1	0	1	0	0				
15	CE18	1	0	1	0	0				
16	CE19	1	0	1	0	0				
17	CE20									
18	CE21									
19	CE22	1	0	1	0	0				
20	CE23	2	0	2	0	0	1	1	0	0
21	CE24	2	0	2	0	0	1	0	1	0

Algunos de los controles que habían producido banda de amplificación en la primera o segunda *PCR* fueron secuenciados para determinar el origen del DNA contaminante. En la **Tabla R32** se muestran las secuencias obtenidas a partir de los controles CE11, CE12 y CE13. En la **Tabla R33** se relacionan, junto a las anteriores, las secuencias de las muestras del mismo grupo de amplificación. Las dos tablas contienen las secuencias de los dos investigadores que realizaron tareas de extracción en el laboratorio.

Tabla R32. Secuencias de cinco controles de extracción que dieron resultado positivo de amplificación y/o reamplificación y de los dos investigadores que realizaron tareas de extracción de DNA antiguo en el laboratorio (I1 e I2). Únicamente se incluyen aquellas posiciones en las que la secuencia difiere de la secuencia consenso ó *CRS* (ANDERSON et al. 1981). C: Citosina; T: Timina; Y: Citosina o Timina. Aquellas posiciones para las que existe información de ambas cadenas de DNA se señalan en negrita. ?: controles reamplificados directamente sin mirar el resultado de la amplificación; +: amplificación positiva.

					1										
					6										
						1	1	2	2	2	2	2	3	3	
						2	6	2	6	7	9	9	0	1	
						6	8	3	1	0	4	6	4	1	
Grupo extracción	Muestra	PCR1	PCR2	T	C	C	C	C	C	C	C	T	T	C	T
				I1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
				I2	C	.	.	.	.	T	T	C	.	.	.
1	CE1	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	CE7	?	+	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.
8	CE11	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	CE12	+	+	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	CE13	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.

Tabla R33. Secuencias de los cinco controles de extracción que proporcionaron un resultado positivo de amplificación y/o reamplificación y de las muestras del mismo grupo de *PCR*. Como en la tabla anterior se incluyen únicamente aquellas posiciones en las que la secuencia difiere de la secuencia consenso ó *CRS* (ANDERSON et al. 1981).

				1												
				6												
				1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	
				2	6	2	5	6	7	9	9	0	1	2	2	
				6	8	3	6	1	0	4	6	4	1	5	7	
Grupo extracción	Muestra	PCR1	PCR2	T	C	C	C	C	C	C	C	T	T	T	C	
				I1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
				I2	C	.	.	.	.	.	T	T	C	.	.	
1	TH1	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
1	TH6	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
1	TH8	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
1	TR1	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	F85	?	+	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	F83	?	+	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	F49	?	+	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
	F67	?	+	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
1	CE1	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
5	TH2	?	+	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	C	.	.	
5	TR7	?	+	.	.	.	.	.	T	.	.	Y	.	.	.	
	F85	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	
5	CE7	?	+	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	
5	BA1	?	+	.	.	.	.	.	.	Y	Y	.	.	.	.	
8	CA7	+		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
8	CE11	+		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
9	AB17	+	+	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	
9	CE12	+	+	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
10	2TM1	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	
10	CE13	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	

Cuando la contaminación afecta a los reactivos empleados durante la extracción cabe esperar que quede afectado también el resto de las muestras de la serie. Si alguna contuviera DNA endógeno, la secuencia resultante sería una mezcla entre éste y el DNA contaminante. Si ambas moléculas de DNA son diferentes, en las posiciones mutadas se visualizarán dos nucleótidos diferentes. En la presente tesis doctoral la secuencia del investigador que extrajo las muestras (I1) es idéntica a la secuencia consenso, por lo que, de acuerdo con lo anterior, cualquier cambio respecto a ésta debería corresponder a la muestra antigua. Por el contrario, si la muestra no presenta DNA o éste está muy degradado la secuencia obtenida corresponderá exclusivamente al DNA contaminante.

Como se aprecia en las **Tablas R32 y R33**, las secuencias de los controles CE1 y CE11 coinciden con la secuencia del investigador I1, idéntica a la secuencia consenso. Las secuencias de algunas de las muestras amplificadas junto con los controles mencionados muestran un patrón similar. Los extractos TH1, TH6, TH8 y TR1 del primer grupo de extracción presentan una secuencia del primer segmento idéntica a la secuencia de su control de extracción (CE1) y a la del investigador que realizó el proceso de extracción (I1). Junto con estas muestras se amplificaron, a manera de control, cuatro muestras de secuencia conocida previamente, estudiadas por nuestro grupo de investigación (GARCÍA-BOUR *et al.* 2004) (F85, F83, F49 y F67). Las secuencias de estas muestras, extraídas con anterioridad por otro investigador (I2), son diferentes a la secuencia de dicho investigador y coinciden con aquellas obtenidas anteriormente por éste. Ello puede considerarse como indicio de la ausencia de contaminación durante la *PCR* del conjunto de muestras del grupo de extracción 1. Análogamente la muestra CA7 del grupo de extracción 8, presenta también una secuencia idéntica al investigador I1, que comparte también con su control de extracción CE11. La ausencia de diferencias entre las secuencias de estas muestras y la secuencia de I1 sugiere que o bien su DNA endógeno coincide también con la secuencia consenso o bien la secuencia obtenida corresponde al investigador y no existe DNA endógeno amplificable.

Para comprobar el alcance de las supuestas contaminaciones de extracción se examinaron aquellas secuencias derivadas de los grupos de extracción supuestamente contaminados (**Tabla 34**).

La secuencia del segundo segmento de la muestra TH6 del *grupo de extracción 1* presenta una posición con doble nucleótido (16311 C ó T). Teniendo en cuenta lo discutido anteriormente, la secuencia mutada –16311C– correspondería a la muestra antigua mientras que la molécula con una T en la misma posición e igual a la secuencia consenso, correspondería al DNA del investigador. Tal hipótesis se ve reforzada por el hecho de que otra muestra del mismo individuo (TH5), extraída en otro grupo diferente, presenta la misma mutación, esta vez sin doble nucleótido. La secuencia del segundo segmento de la muestra TH8 de este mismo grupo de extracción coincide con la secuencia consenso y, consiguientemente, con la secuencia del investigador I1. Todas las evidencias apuntan a que durante la extracción del primer grupo de muestras éstas fueron contaminadas con DNA del investigador I1.

Tres de las cuatro secuencias obtenidas del *grupo de extracción 8* difieren en una (CA7, TO1) o dos posiciones (AB9) de la secuencia del investigador I1 (**Tabla R34**). De haberse producido una contaminación generalizada durante la fase de extracción, las secuencias serían iguales entre sí y a la secuencia consenso, o bien presentarían posiciones con doble nucleótido. Los resultados sugieren que esto no ha ocurrido, por lo que la contaminación del control de extracción en esta amplificación corresponde probablemente a una contaminación puntual por parte del investigador durante el proceso de amplificación, la cual, por otra parte, no habría afectado al correspondiente control de amplificación. Por consiguiente la secuencia del primer fragmento de CA7, amplificada junto a dicho control debe de ser eliminada.

Las secuencias de los controles de los dos restantes grupos de extracción (9 y 10) son diferentes a la secuencia consenso y a la del investigador I1, y difieren también de las secuencias obtenidas de las muestras de sus correspondientes grupos. El grupo de extracción 5 presentó también contaminación durante la amplificación, por lo que serán discutidas en el apartado 5.2.2.1.2 “Blancos de amplificación”. La secuencia del control de extracción del *grupo 9*, CE12, es diferente a la secuencia del investigador I1 y también a la de la muestra AB17, del mismo grupo de extracción y amplificación. Una segunda amplificación independiente a partir del extracto de extracción de AB17 proporcionó un resultado idéntico, lo que sugiere que se trata de una secuencia endógena a la muestra. Ninguna de las secuencias de las muestras del mismo grupo de

extracción obtenidas en otras amplificaciones no contaminadas presentaron la secuencia del control de extracción (**Tabla R34**).

La secuencia del control de extracción del **grupo 10**, CE13, coincide con la secuencia de la muestra 2TM1, del mismo grupo de extracción y amplificación, siendo ambas diferentes de la secuencia del investigador I1. La muestra TM5 de este grupo de extracción exhibe esta misma secuencia. Sin embargo las otras seis secuencias del mismo segmento obtenidas presentaban un patrón mutacional totalmente diferente. Estos resultados sugieren que probablemente la secuencia de la muestra 2TM1 sea endógena, y que el control de extracción haya resultado contaminado por ésta mediante un proceso de *carry over* o quizás a través del traspaso de DNA de uno a otro pozo del gel de azarosa, puesto que ambas muestras ocupaban carriles contiguos. A pesar de que existen razones para pensar que la secuencia de 2TM1 es endógena, ésta no fue considerada finalmente por precaución.

Otros controles contaminados no secuenciados fueron CE2, CE6 y CE8. Tales controles se corresponden con los **grupos de extracción 2, 4 y 6** respectivamente. En la **Tabla R34** se incluyen también las secuencias obtenidas de estos grupos de extracción. Ninguna de las secuencias obtenidas en dichos grupos concuerda con la del investigador I1 exceptuando la de la muestra 2PI del grupo de extracción 4. Todas las secuencias de este grupo de extracción son diferentes entre sí, lo que excluye también la posibilidad de contaminación por otra fuente diferente al investigador I1. En el grupo de extracción 8 únicamente las secuencias de TR16 y TR18 son iguales entre sí aunque diferentes al conjunto restante. Una vez más, tampoco hay aquí indicios de una contaminación de extracción generalizada.

Las observaciones anteriores junto con el hecho de que diferentes amplificaciones de un mismo control de extracción podían suministrar resultados positivos y negativos pone en duda la validez de los resultados de contaminación obtenidos. Ante la sospecha de que la amplificación de los controles de extracción junto con las muestras puede propiciar la aparición de falsos positivos en los controles, se amplificaron los mismos en ausencia de muestras. Los resultados obtenidos se comentan en el siguiente apartado.

Tabla 34. Secuencias obtenidas a partir de las muestras de los grupos de extracción cuyos blancos resultaron contaminados.

[illegible]

Tabla 34. (Continuación).

[illegible]

5.2.2.1.1.2. Amplificación de los controles aisladamente

Se amplificaron los controles de extracción en ausencia de muestras tal y como se describe en el apartado 14.2.4.1.2. del capítulo “Métodos”. En la **Tabla R35** se muestran los resultados de las diferentes amplificaciones realizadas.

Tabla R35. Resultados de la amplificación y reamplificación de los controles de extracción en ausencia de muestras. -: resultado negativo de amplificación.

Control extracción	Amplificación		Reamplificación	
	Grupo amplificación	Resultado	Grupo reamplificación	Resultado
CE1	1	-	1	-
CE2	1	-	1	-
CE3	1	-	1	-
CE4	1	-	1	-
CE5	1	-	1	-
CE6	1	-	1	-
CE7	2	-	2	-
CE8	2	-	2	-
CE9	2	-	2	-
CE11	2	-	2	-
CE12	2	-	2	-
CE13	2	-	2	-
CE14	3	-	3	-
CE15	3	-	3	-
CE16	3	-	3	-
CE17	3	-	3	-
CE18	3	-	3	-
CE19	3	-	3	-
CE20	4	-	4	-
CE21	4	-	4	-
CE22	4	-	4	-
CE23	4	-	4	-
CE24	4	-	4	-

Como puede apreciarse en la tabla, ninguno de los controles de extracción proporcionó resultado positivo de amplificación ni de reamplificación en los ensayos realizados. Este resultado viene a sugerir que la aparente contaminación de extracción – detectada en los grupos de amplificación en los que se incluían estos controles y muestras– es en realidad una contaminación acontecida durante la amplificación, por parte del propio investigador II o mediante el fenómeno de *carry over*.

En los grupos de amplificación 4 y 5 las secuencias de los dos controles son idénticas a la secuencia consenso y por tanto a la secuencia del investigador I1. Ninguna de las secuencias de las muestras de sus respectivos grupos de amplificación coincide con la secuencia consenso, lo que apunta a una contaminación puntual durante la *PCR*.

Tabla R38. Secuencias de muestras de 6 grupos de amplificación cuyo blanco de *PCR* proporcionó un resultado positivo de amplificación y/o reamplificación y de los dos investigadores que realizaron tareas de extracción de DNA antiguo en el laboratorio (I1 e I2). Únicamente se incluyen aquellas posiciones en las que la secuencia difiere de la secuencia consenso ó CRS (ANDERSON *et al.* 1981). C: Citosina; T: Timina; Y: Citosina o Timina. Aquellas posiciones para las que existe información de las dos cadenas de DNA aparecen marcadas en **negrita**.

Grupos de marcadores en negro					
				1	
				6	
				1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3	
				2 2 9 2 2 6 7 8 9 9 9 0 0 1	
				6 9 2 3 4 1 8 7 3 4 6 4 9 1	
	Grupo amplificación	PCR1	PCR2	T G C C T C C C A C C T A T	
I1				.	.
I2				C	.
TR18	6	C	+	.	.
AB20	7	+	C	.	.
2H13	8	C		.	.
1MA6	9	+	C	T	.
AB13	10	C		.	.
AB14		C		.	.
AB15		C		.	.
1TM2		C		.	.
1H18		C		.	.
SK106	11	C	+	.	.

Las muestras AB20, 2H13, AB14, AB15 y SK106 (**Tabla R38**) presentan una secuencia igual la del investigador I1. Para las muestras AB20, 2H13 y SK106 no se dispone de secuencia del mismo segmento obtenida a partir de una amplificación no contaminada. La secuencia del segundo segmento de la muestra AB14 presenta 4 mutaciones no ambiguas, mientras que la de la muestra AB15 coincide también con la secuencia consenso. Todo indica, pues, que se trata de una contaminación del investigador I1 durante el proceso de amplificación, aunque para poder ratificarse en esta afirmación sería necesario analizar la secuencia del blanco contaminado, puesto que podría suceder que su secuencia no coincidiera con la de las muestras, tal y como ha sucedido en los casos en los que esto fue llevado a cabo.

De las secuencias restantes, diferentes a la secuencia del investigador, destacan especialmente las correspondientes a las muestras TR18 y 1MA6, puesto que ambas presentan mutaciones no ambiguas. La secuencia de la muestra TR18 coincide con la obtenida de otra amplificación no contaminada, por lo que podría concluirse que es endógena, aunque no puede ser aceptada dadas las circunstancias. La secuencia de la muestra 1MA6 coincide con las de otras dos muestras del mismo yacimiento, 1MA4 y 1MA12, por lo que es bastante probable que se trate pues de una secuencia endógena.

Las secuencias de los extractos de AB13, 1TM2 y 1H18, todas del mismo grupo de amplificación, presentan lugares con doble nucleótido. Las secuencias del mismo segmento obtenidas para las muestras 1TM2 y 1H18 son completamente diferentes de las secuencias analizadas aquí, por lo que probablemente en estos dos casos se trate de secuencias “artefacto”, generadas por “*jumping PCR*” a partir de fragmentos de DNA contaminante de origen desconocido. Para la muestra AB13 no pudo obtenerse la secuencia correspondiente al segundo segmento, por lo que, en este caso, la secuencia obtenida podría contener una mezcla de dos moléculas de DNA, una endógena que llevaría la C en la posición ambigua y la otra contaminante procedente del investigador, que llevaría la T.

Ninguna de las secuencias consideradas “definitivas” procede de un grupo de extracción y/o amplificación en el que se detectara contaminación en los blancos.

5.2.2.2. Replicación de las muestras dentro del laboratorio

Se han obtenido secuencias a partir de diferentes amplificaciones de una misma muestra en 10 casos: AB17 (2 secuencias del primer segmento), 2TM4 (2 secuencias del primer segmento), 4NE (2 secuencias del segundo segmento), TH4 (2 secuencias del segundo segmento), 1H18 (2 secuencias del segundo segmento), 1H21 (2 secuencias del segundo segmento), TR7 (3 secuencias del segundo segmento), DJ3 (2 secuencias del primer segmento), 2MA4 (2 secuencias del primer segmento) y 1MA8 (2 secuencias del primer segmento).

Igualmente, se han recuperado secuencias a partir de diferentes extractos de un mismo individuo en 6 casos: H7 (muestras TH5 y TH6, 2 secuencias del segundo segmento), H70 (2H11 y 3H11, 2 secuencias del primer y segundo segmento), R 65-4 II (TR9 y TR11, dos secuencias del primer y segundo segmento), SK-R 3 (1DJ6 y 2DJ6, dos secuencias del segundo segmento), MA4 (1MA4 y 2MA4, 2 secuencias del primer y segundo segmento) y AH 95 2c-2 (SK107-3 y SK107-4, dos secuencias del primer segmento).

En 6 casos (13 secuencias) se detectaron inconsistencias entre diferentes amplificaciones de una misma muestra y en 3 (6 secuencias) entre diferentes extractos de un mismo individuo. Estas secuencias no fueron tenidas en cuenta para los cálculos filogenéticos. En los casos restantes las secuencias recuperadas mostraron el mismo patrón mutacional, lo que contribuye a reforzar su autenticidad. Todas estas secuencias se resumen en la **Tabla R39**.

La aparición de secuencias distintas a partir de diferentes amplificaciones de una misma muestra o individuo puede responder a varias razones. Una de las explicaciones más simple es la presencia de moléculas de DNA de diferente naturaleza en el extracto original por heteroplasmia. Otra causa puede ser la contaminación procedente de la excavación o del investigador que realizó la extracción. Finalmente, se puede deber a la existencia de cadenas “dañadas” en algunas posiciones (*miscoding lesions*). Sin embargo esta situación puede responder, también, a la introducción de una contaminación puntual durante el proceso de amplificación no detectada en los blancos. Aunque la fuente más probable de esta última contaminación sea el investigador que

realiza el proceso de amplificación, durante la *PCR* es frecuente el fenómeno de *carry over*, esto es, amplificación de moléculas de DNA procedentes de otras muestras de la misma o de amplificaciones anteriores que, en forma de aerosoles, flotan en el ambiente. Finalmente, el fenómeno del *jumping PCR* puede contribuir a formar secuencias artefactuales a partir de fragmentos de DNA contaminante y DNA endógeno.

Mientras que la frecuencia de heteroplasma descrita es muy baja, los otros tres fenómenos son muy frecuentes en el estudio de restos antiguos, especialmente cuando la cantidad de DNA endógeno en el extracto es escasa. Todas las situaciones señaladas tienden a producir lugares con doble nucleótido en aquellas posiciones en las que las secuencias de diferente naturaleza difieren entre sí. Se diferencian, así, de la heteroplasma, la cual suele afectar a un único sitio (BENDALL *et al.* 1996).

Tabla R39. Secuencias obtenidas a partir de diferentes ampliificaciones de una misma muestra y extractos de un mismo individuo. Se señalan en cursiva aquellas secuencias en las que se detectaron inconsistencias entre las diferentes ampliificaciones. Únicamente se representan aquellas posiciones en las que se detectaron sustituciones en, al menos, un individuo. El punto (·) indica la presencia del mismo nucleótido que en la secuencia de referencia o *CRS* (ANDERSON *et al.* 1981). Los cambios respecto a ésta se indican con la inicial de la base nitrogenada correspondiente: C: citosina; T: timina; A: Adenina y G: Guanina. Las posiciones con doble nucleótido se señalan también de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC: Y: C ó T; W: A ó T; S: G ó C; M: A ó C y R: A ó G. Aquellas posiciones para las que existe información de las dos cadenas de DNA aparecen marcadas en **negrita**

		1																											
		6																											
		1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	
		2	2	6	6	8	8	8	9	2	2	5	6	6	7	7	8	8	9	9	9	9	0	0	1	1	2	5	6
Procedencia	Individuo	Muestra	6	9	3	8	6	7	9	2	3	4	6	1	4	0	4	8	4	8	0	3	4	6	1	4	9	1	9
		CRS	T	G	T	C	C	T	C	C	T	C	C	C	C	G	C	A	T	C	A	C	C	T	A	T	G	C	T
Abauntz	AB35E	AB17(1)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB35E	AB17(2)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Açikli	AH95 2c-2	SK107-3	Y	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Açikli	AH95 2c-2	SK107-4	Y	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Dja'de	SK-D4 16	DJ3(1)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Dja'de	SK-D4 16	DJ3(2)	·	A	·	·	·	·	·	·	·	T	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	4	1M44	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	4	2M44	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	4	2MA4(1)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	4	2MA4(2)	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	8	1M48.1	·	·	·	·	·	Y	Y	·	·	T	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	8	1M48.2	C	·	C	·	T	T	C	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Nerja	NE-NAP	4NE(1)	·	T	T	·	·	·	·	·	G	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Nerja	NE-NAP	4NE(2)	·	T	T	·	·	·	·	·	G	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Tell Halula	H-4	TH4.1	·	·	T	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Tell Halula	H-4	TH4.2	·	·	Y	R	Y	R	Y	Y	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Tell Halula	H-7	TH5	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Tell Halula	H-7	TH6	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Tell Halula	H-70	2H11	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Tell Halula	H-70	3H11	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Tell Halula	H-70	2H11	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Tell Halula	H-70	3H11	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·

Tabla R39. (Continuación).

[illegible]

La contaminación por el personal de laboratorio puede ser fácilmente detectada comparando la secuencia obtenida con las secuencias de los investigadores. La secuencia del investigador que realizó la mayor parte de las extracciones y todas las amplificaciones (I1) y que por tanto presenta una mayor probabilidad de haber contaminado las muestras coincide con la secuencia consenso, por lo que cabría esperar que en aquellas secuencias con posiciones ambiguas cualquier diferencia respecto a ésta sea endógena a la muestra.

La contaminación por *carry over* resulta más difícil de controlar, aunque la comparación de la secuencia sospechosa con las del mismo grupo de amplificación puede proporcionar importantes pistas al respecto.

El fenómeno de *jumping PCR* tiende a generar secuencias con escasa, incluso nula, representación en la humanidad actual (MONTIEL 2001), por lo que la búsqueda de estas secuencias en bases de datos de población actual resulta clave para su detección.

Por otra parte el daño molecular manifiesta una predilección por ciertos tipos de cambio (GILBERT *et al.* 2003b) y por ciertas posiciones (GILBERT *et al.* 2003a) y se manifiesta preferentemente cuando el número de copias de DNA molde es inferior al millar (HANDT *et al.* 1996). El número de copias iniciales presentes en los extractos de DNA de las muestras de la **Tabla R39** supera en todos los casos la décima de millar. Por este motivo, en principio, resulta improbable que la causa de la discrepancia entre las secuencias de diferentes amplificaciones sea el daño molecular.

Una de las secuencias obtenidas de la **muestra 1DJ3**, igual a la secuencia consenso (*CRS*), es única entre las secuencias de las muestras de su misma serie de amplificación (**Tabla R40**). La otra secuencia es, asimismo, inédita en su grupo, pero coincide con la de la muestra 1DJ4 procedente de una *PCR* contaminada. Su haplotipo parcial: 16129A-16192C-16223C no aparece ni en nuestra base de datos ni en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000, aunque su patrón mutacional indica que pertenece al haplogrupo I Europeo. La probabilidad de que se reproduzcan tres mutaciones en dos extractos de DNA diferente es muy baja, lo que apoya la autenticidad de la segunda secuencia de DJ3 y por tanto de DJ4. A pesar de ello no se tuvo en cuenta

ninguna de las dos secuencias pues no cumplían con los criterios de autenticidad propuestos en el apartado 14 del capítulo “Métodos” de la presente tesis doctoral.

Las secuencias obtenidas de dos extractos del *individuo 4 de Mari* (1MA4 y 2MA4) son inéditas dentro de sus respectivos grupos de *PCR* (**Tabla R40**). La secuencia de la muestra 2MA4 coincide con la del individuo 1MA12, de una amplificación del mismo día, pero de un grupo de *PCR* diferente, y, curiosamente, todas las posiciones mutadas presentan doble nucleótido. La combinación de mutaciones de la referida muestra 1MA4 (16290T, 16319A y 16362C) son características del haplogrupo A asiático-americano. Aunque a priori pueda resultar extraño la presencia de una secuencia de origen asiático en un yacimiento europeo, no hay que olvidar que la ciudad de Mari fue en su momento una importante sede comercial y por tanto un lugar común de paso (MARGUERON 2003). La secuencia del extracto 1MA4 presenta cuatro mutaciones ambiguas que hoy en día se encuentran asociadas al haplogrupo Africano L2 (16261T, 16278T, 16294T y 16309G). La probabilidad de que a partir de dos muestras de un mismo individuo se reproduzcan por azar dos haplotipos asociados a grupos étnicos tan concretos y muy poco frecuentes en población europea actual es prácticamente nula. Excluyendo la contaminación de laboratorio por razones obvias, las únicas dos posibilidades que restan son o que ambas muestras procedan de diferentes individuos, o que haya tenido lugar una contaminación por parte del personal encargado de la excavación arqueológica. Aunque la primera de las hipótesis resulta más factible, puesto que no se encuentra documentada la existencia de personal de origen asiático y/o africano en la Misión Arqueológica de Mari (Dra. Eva Chadwick, comunicación personal), ninguna de las dos secuencias fueron incluidas en el análisis filogenético y estadístico, por precaución.

Las dos secuencias de la *muestra 1MA8* pertenecen al mismo grupo de amplificación y son diferentes al resto de secuencias de este grupo (**Tabla R40**). Ninguno de los dos haplotipos están representados en nuestra base de datos ni en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000. Uno de estos haplotipos parciales (16126C-16163C-16186T-16187T-16189C) presenta algunas de las mutaciones típicas del haplogrupo Africano L1b, dos de ellas comunes a la otra secuencia de la misma muestra (16186T, 16187T). La tercera mutación de este segundo haplotipo—no presente en el primero (16223T)—aparece comúnmente asociada a las otras mutaciones en el

haplogrupo L1b. La primera de estas secuencias podría haberse generado por *jumping PCR* a partir de fragmentos de la segunda.

La segunda secuencia de la **muestra TH4** presenta un total de 10 sustituciones, todas ellas con doble nucleótido, en el fragmento de 112pb. Este haplotipo parcial, con un número tan elevado de mutaciones, no se corresponde con ningún otro individuo de las bases de datos analizadas, aunque algunas de ellas aparecen combinadas en ciertos linajes africanos (16270T, 16278T, 16301T, 16311C). La presencia de lugares con doble nucleótido sugiere que podría tratarse de un caso de contaminación, donde la secuencia mutada correspondería al individuo analizado y la secuencia consenso al investigador II. Sin embargo, la singularidad de estas mutaciones y el elevado número de las mismas hace pensar que se trate de una molécula quimérica producida por *jumping PCR* a partir de fragmentos de DNA contaminante. La otra secuencia obtenida en una amplificación independiente de la misma muestra presenta únicamente dos mutaciones, una de ellas con doble nucleótido. Esta mutación aparece, además, en las secuencias de otras dos muestras de su mismo grupo de amplificación, TH5 y TR12 (**Tabla R40**), por lo que podría tratarse de un fenómeno de *carry over* de uno de estos individuos a la secuencia TH4. Sin embargo el resto de las secuencias del mismo grupo no presentan esta mutación. Aunque poco frecuente, este haplotipo está representado en nuestra base de datos en tres individuos procedentes de Noruega y figura, también, en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000 en dos individuos escandinavos. Aunque podría tratarse de una secuencia endógena, bajo estas condiciones no puede ser considerada.

La secuencia del extracto 2H11 del **individuo H70** presenta una sola mutación no ambigua en la posición 16356 y es la única entre las secuencias de su serie de amplificación (**Tabla R40**). Teniendo en cuenta la información del primer segmento (**Tabla R62**), el haplotipo 16356C pertenece al haplogrupo U4 y está descrito en Europa y Próximo Oriente, tanto en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000 como en nuestra base de datos. La secuencia correspondiente a la muestra 3H11 del mismo individuo presenta dos mutaciones con doble nucleótido, y es también única en su serie de amplificación, por lo que, en principio cabría descartar el fenómeno del *carry over* como responsable de su origen. El haplotipo 16304C-16311C es único entre las secuencias antiguas obtenidas, y tampoco está presente en una amplia base de datos

de secuencias mundiales actuales. Sin embargo está descrito en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000 en un individuo del noroeste de Europa. Ambas posiciones son lugares de daño molecular (ver Tabla I6 del capítulo “Introducción”). De nuevo aquí las lecturas del número de copias de DNA *template* originales proporcionan valores por encima de 10^4 , lo que permite descartar el daño molecular como factor causal de la discrepancia entre las dos secuencias obtenidas.

La primera amplificación de la muestra **1H18** proporcionó una secuencia con sólo una mutación. Tal mutación es única en su grupo de *PCR* (**Tabla R40**) y, teniendo en cuenta la información del primer segmento (**Tabla R62**), el haplotipo completo (16270T) es común en población europea, donde se clasifica dentro del haplogrupo U5. La secuencia obtenida de la segunda amplificación no presenta mutaciones y tampoco coincide con secuencia alguna de su mismo grupo de amplificación. Como el haplotipo del investigador I1 es igual a la secuencia consenso resultaría posible que en la segunda amplificación se hubiese producido una contaminación puntual, lo que llevaría a considerar la secuencia de la primera amplificación como auténtica. Sin embargo, puesto que no se cumple el criterio de replicación, ambas secuencias fueron descartadas.

La secuencia de la primera de las amplificaciones de la **muestra 1H21** presenta 5 sustituciones con doble nucleótido, ninguna de las cuales aparece en las secuencias de las muestras del mismo grupo de amplificación (**Tabla R40**). Ahora bien, tres de estas sustituciones están presentes en la secuencia de una amplificación de la misma muestra llevada a cabo el mismo día, en otro grupo, y que resultó contaminada. La secuencia de la segunda de las amplificaciones es igual a la secuencia consenso. De nuevo aquí la secuencia de la primera amplificación podría ser auténtica si consideramos la de la segunda como resultado de la contaminación por parte del investigador I1. De ser así cabría suponer que la presencia de dobles nucleótidos se debe a la existencia de dos secuencias diferentes: una endógena a la muestra con cinco mutaciones y otra contaminante e igual a la secuencia consenso probablemente procedente del investigador I1. Esta hipótesis sin embargo no explica por qué ninguna de las cuatro mutaciones de la secuencia de AB14 presenta doble nucleótido, lo que sería de esperar de haber sido este grupo contaminado por el investigador I1. Puesto que ninguna de las dos explicaciones resulta totalmente satisfactoria tampoco se han tenido en cuenta estas dos secuencias.

En relación con la **muestra TR7** existen 3 secuencias del segundo segmento, todas ellas diferentes y con mutaciones sin doble nucleótido. A excepción de la primera, común a aquella obtenida de la muestra TR9 de su mismo grupo de *PCR*, ninguna de las otras dos secuencias presentan homólogos en sus respectivos grupos (**Tabla R40**). La segunda de las secuencias coincide con la de uno de los arqueólogos implicados en su obtención (ver apartado 5.2.2.3. de este mismo capítulo), por lo que podría tratarse de un caso de contaminación de extracción, por más que resulta extraño que ésta haya afectado tan sólo a una de todas las muestras excavadas. La tercera de las secuencias tiene tres mutaciones comunes a uno de los investigadores del laboratorio (I2), sin embargo la posibilidad de contaminación por su parte es muy remota puesto que en el momento de su extracción y amplificación dicho investigador ya no formaba parte del equipo de trabajo, y no hubo contacto alguno entre él y la muestra. Las tres secuencias fueron eliminadas.

La secuencia de la **muestra TR9** es única en su grupo de amplificación (**Tabla R40**) y no presenta ninguna posición con doble nucleótido. La del extracto TR11 perteneciente al mismo individuo es común a la de la muestra TR19 de su mismo grupo de amplificación, por lo que podría tratarse de un *carry over* entre ambas. Las secuencias correspondientes al segundo segmento de los dos extractos del mismo individuo son idénticas, y ambas presentan la mutación 16293C. Ninguna de las combinaciones 16129A-16293C (TR9) y 16224C-16293C (TR11) es común en población europea ni de Próximo Oriente (base de datos interna y relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000). Sin embargo el individuo TR8 del mismo yacimiento, presenta el haplotipo 16129A-16293C, lo que podría apuntar a la autenticidad de la primera de estas dos secuencias. A pesar de todo, esta secuencia tampoco fue considerada por no ser consistente su replicación.

Tabla R40. Secuencias obtenidas clasificadas en grupos de amplificación. Se señalan en cursiva aquellas secuencias en las que se detectaron inconsistencias entre las diferentes amplificaciones. Únicamente se representan aquellas posiciones en las que se detectaron sustituciones en al menos un individuo. El punto (·) indica la presencia del mismo nucleótido que en la secuencia de referencia ó *CRS* (ANDERSON *et al.* 1981). Los cambios respecto a ésta se indican con la inicial de la base nitrogenada correspondiente: C: citosina; T: timina; A: Adenina y G: Guanina. Las posiciones con doble nucleótido se señalan también de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC: Y: C ó T; W: A ó T; S: G ó C; M: A ó C y R: A ó G. Aquellas posiciones para las que existe información de las dos cadenas de DNA aparecen marcadas en negrita.

			1																																
			6																																
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	2	2	4	6	8	8	9	1	2	2	3	3	6	7	7	8	8	9	9	9	9	9	9	0	0	0	1	1	2	2	2	5	5	6	6
	6	9	5	3	6	7	9	2	8	3	4	1	4	1	0	4	8	4	8	0	3	4	6	7	8	1	4	9	1	9	0	5	7	5	6
	Grupo		T	G	G	T	C	C	T	C	C	T	T	C	C	G	C	A	T	C	A	C	C	T	T	C	T	A	T	G	C	T	C	T	
	amplificación		Procedencia	Muestra																															
			Tell Halula TH4																																
			Tell Halula TH5																																
			Tell Ramad TR7																																
			Tell Ramad TR9																																
			Tell Ramad TR12																																
			Tell Ramad TR19																																
			Tell Halula TH8																																
			Tell Halula TH4																																
			Tell Ramad TR7																																
			Mari 3MA11																																
14			Tell Halula TH6																																
			Tell Halula 2H11																																
			Tell Halula IH18																																
15			Toledo TO1																																
			Tres Montes ITM6																																
			Tell Halula IH18																																
			Tell Halula 3H11																																
16			Tell Halula IH21																																
			Tell Halula IH15																																
17			Abauntz AB14																																
			Tell Halula IH21																																

Tabla R40. (Continuación).

[illegible]

poblaciones europeas actuales. Tanto la frecuencia observada de este haplotipo completo como la del haplotipo parcial del segundo segmento en el conjunto de secuencias antiguas obtenidas son menores a las esperadas. La frecuencia observada del haplotipo parcial del primer segmento es ligeramente superior a la esperada aunque no lo suficiente como para considerar que esta desviación esté causada por contaminación.

Tabla R42. Frecuencia de los haplotipos completos y parciales del personal investigador y arqueológico en la base de datos de poblaciones actuales construida para la presente tesis doctoral.

Investigador/ Arqueólogo	Secuencia completa		Primer segmento		Segundo segmento	
	Haplotipo	Frecuencia (%)	Haplotipo	Frecuencia	Haplotipo	Frecuencia
I1	CRS	13.03	CRS	27.49	CRS	37.9
I2	16126C,16294T,16296T,16304C	1.03	16126C	7.28	16294T,16296T,16304C	1.27
I3	16302C	0	CRS	27.49	16302C	0
A1	16168T	0.071	16168T	0.17	CRS	37.9
A2	16261T	0.17	CRS	27.49	16261T	1.91

Tabla R43. Frecuencias absolutas observada y esperada de los haplotipos completos y parciales del personal investigador y arqueológico, respectivamente, en el conjunto de secuencias antiguas obtenidas y cociente entre ambas. La frecuencia esperada se calcula a partir de la frecuencia de estos mismos haplotipos en la base de datos de poblaciones actuales construida para la presente tesis doctoral.

Investigador/ Arqueólogo	Secuencia completa			Primer segmento			Segundo segmento		
	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Obs/Esp	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Obs/Esp	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Obs/Esp
I1	3	6.38	0.46	25	18.96	1.31	20	32.21	0.62
I2	3	0.5	6	10	5.03	1.98	6	1.07	5.55
I2*	0	0.5	0	3	5.03	0.19	1	1.07	1.85
I3	0	0	-	25	18.96	1.31	0	0	-
A1	0	0.034	0	0	0.12	0	20	32.21	0.62
A2	0	0.087	0	25	18.96	1.31	1	1.62	0.61

Las secuencias de las muestras ZA13 y ZA16, supuestamente pertenecientes a dos individuos neandertalenses, son iguales a la secuencia consenso y al investigador I1. Estos mismos individuos fueron analizados por un equipo internacional con resultado negativo (BARRIEL *et al.*, en prensa). Este resultado y las grandes diferencias entre las secuencias recuperadas y de Neandertal publicadas hasta la fecha (SERRE *et al.* 2004; LALUEZA-FOX *et al.* 2005; SCHMITZ *et al.* 2002; KRINGS *et al.* 2000, 1997; OVCHINNIKOV *et al.* 2000), apunta a que las secuencias de ZA13 y ZA16 son contaminaciones por parte del investigador I1, introducidas de forma puntual durante la amplificación.

El haplotipo del investigador I2, que realizó la extracción de algunas muestras (ver apartado 14.2.3. del capítulo “Métodos”), es poco frecuente en población actual (Tabla R42) por lo que si su presencia en el conjunto de secuencias obtenidas fuera elevada sería evidente que ha habido contaminación durante el proceso de extracción.

En la **Tabla R43** se aprecia que las frecuencias observadas de este haplotipo completo y de los correspondientes haplotipos parciales del primer y segundo segmentos son del orden de 2 a 6 veces superiores a las frecuencias esperadas. Si se suprimen todas aquellas secuencias con este haplotipo procedentes de muestras extraídas por dicho investigador, la relación entre la frecuencia observada y esperada es igual o inferior a uno (**Tabla R43**, I2*). Ello indica que, en este caso, la mayor parte de secuencias con un haplotipo idéntico al del investigador I2 no son originarias de la muestra, sino que son producto de contaminación introducida durante la extracción de su material genético. Todas las secuencias con este haplotipo, total o parcial, procedentes de aquellas muestras extraídas por dicho investigador fueron eliminadas del conjunto inicial. Fueron descartadas, también, las secuencias de las muestras AT25, GA15, GA24, GA50 y TA3, extraídas por I2 y que exhibían otras mutaciones además de las de dicho investigador.

Ninguna de las secuencias obtenidas coincide con la del investigador I3. Su haplotipo tampoco aparece representado en la base de datos de secuencias actuales diseñada para el presente estudio. Se trata de un motivo poco común que sí que aparece en un individuo europeo de la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000. El haplotipo parcial del primer segmento coincide con la secuencia consenso, caso que ya hemos comentado anteriormente. El del segundo segmento tampoco coincide ni con ninguna de las secuencias antiguas recuperadas ni con las de la base de datos.

El haplotipo completo del arqueólogo A1 no aparece en ninguna de las secuencias antiguas obtenidas. El haplotipo parcial del primer segmento tampoco pero sí el del segundo segmento, que coincide con la secuencia de referencia. Igual que sucedía con el investigador I1, la frecuencia observada de este haplotipo parcial es inferior a la esperada, por lo que no existen razones para pensar en la contaminación de las muestras con esta secuencia.

El haplotipo completo del antropólogo A2 tampoco está representado en las secuencias antiguas obtenidas. El haplotipo parcial del primer segmento se corresponde con la secuencia consenso, caso que ya hemos comentado anteriormente mientras que el del segundo segmento, presente en baja frecuencia en la población actual, aparece en una única secuencia de la muestra TR7. Esta amplificación fue replicada otras dos veces

obteniéndose en cada caso una secuencia diferente por lo que resulta, en principio, posible que la secuencia con el haplotipo de A2 provenga de éste. Sin embargo, tal y como se comenta en el apartado 5.2.2.1., resulta muy sorprendente que la contaminación durante la excavación sólo haya afectado a una de las muestras excavadas.

En la **Tabla R43** se detalla el conjunto de secuencias eliminadas tras aplicar este criterio.

Tabla R43. Secuencias eliminadas puesto que coincidían con la secuencia de uno de los investigadores (I2).

			Investigadores (12):																
			1																
			6																
			1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
			2	9	4	5	7	8	9	9	0	2	2	2	2	2	2	3	6
Procedencia	Individuo	Muestra	6	3	5	6	0	7	4	6	4	0	2	6	7	8	8	2	
			CRS	T	C	C	C	C	C	C	C	T	C	A	A	C	C	A	T
			I2	C	.	.	.	.	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	
Atxuri	AX-3	AT15		.	.	.	.	.	T	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.	
Atxuri	AX-4	AT16		.	X	Y	Y	.	T	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.	
Atxuri	AX-13	AT25		.	.	.	.	.	T	T	C	.	.	.	Y	.	.	.	
Atxuri	G15	GA15		.	.	.	.	.	T	Y	Y	.	.	.	.	.	.	A	
Atxuri	G24	GA24		.	.	.	?	?	T	Y	C	T	.	.	.	A	.	.	
Atxuri	G50	GA50		.	.	.	.	.	T	T	C	.	W	R	.	.	C	.	
Caldeirao	R12 sc 71	CA3	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Caldeirao	012 194	CA4	C	.	.	.	.	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	
Muge	TAS 168	TA1	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Muge	TAS 214	TA2	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Muge	TAS 216	TA3	Y	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Açikli	8a AH89	16SK2	C	.	.	.	.	.	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.	
Açikli	AH 95 2c-1	SK106		.	.	.	.	.	T	.	C	Y	.	.	.	.	.	.	
Açikli	AH 95 2c-2	SK107-3	Y	.	.	.	.	.	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.	
Açikli	AH 95 2c-2	SK107-4	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Zafarraya	ZA13	ZA13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Zafarraya	ZA16	ZA16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

5.2.2.3.2. Búsqueda de las secuencias obtenidas en una base de datos de secuencias actuales de la misma región geográfica o de regiones próximas

La **Tabla R44** muestra los resultados de la búsqueda de los haplotipos de las muestras antiguas en la base de datos de secuencias de poblaciones actuales. La mayoría de las secuencias antiguas parciales y/o completas recuperadas están representadas en esta muestra de población actual. Únicamente 22 de estas secuencias (30.13%) no aparecen en la mencionada base de datos. Tales haplotipos han sido destacados con negrita en la **Tabla R44**.

Esta ausencia de representación de los haplotipos antiguos en la base de datos de secuencias actuales puede tener dos posibles interpretaciones. La primera de ellas es que la secuencia completa sea auténtica. En este caso su ausencia en la base de datos puede deberse bien a que sea un haplotipo minoritario actualmente o a que se trate de un linaje extinguido, presente en la población antigua pero no en la actual. La segunda de las interpretaciones es que una o ambas secuencias parciales sean contaminaciones con DNA exógeno. Una vez descartada la contaminación por el personal investigador y/o arqueológico (ver apartado anterior) la fuente de contaminación más probable es la contaminación por *carry over* durante la amplificación a partir de amplicones de DNA generados con anterioridad.

La amplificación de cada uno de los dos fragmentos que conforman la secuencia completa se realizó de forma independiente en días distintos. De existir contaminación en ambos experimentos, es de esperar, en términos de probabilidad, que la fuente de DNA contaminante en cada caso sea diferente. Suponiendo que todos los amplicones de DNA tienen la misma probabilidad de contaminar, es de esperar que si uno o ambos segmentos resultan contaminados no debería existir concordancia entre el haplotipo del primer y del segundo segmento. La probabilidad de que la secuencia completa esté o no representada en la población actual dependerá de la probabilidad de que las mutaciones presentes en cada fragmento estén asociadas o no a algún haplogrupo o variante mitocondrial concreta.

Discernir entre una y otra posibilidad mediante la única aplicación de este criterio es sumamente complicado y por lo tanto, tal como se comentaba en el apartado

14.4.1.2. del capítulo “Métodos”, la exclusión de secuencias sospechosas de haber sufrido contaminación por *carry over* únicamente se realizó en aquellos casos en los que existían otras razones para sospechar que ésta había tenido lugar. Más concretamente la presencia de posiciones ambiguas en las que en la secuencia original aparecía más de un único nucleótido, habitualmente dos, fue empleada como criterio de descarte. En este sentido y ligándolo con el siguiente apartado resulta interesante resaltar que en 7 de las 19 muestras cuyo haplotipo completo no está representado en la base de datos de poblaciones actuales alguna de las secuencias parciales presenta al menos una posición con doble nucleótido.

Cuando son los haplotipos parciales los que no encuentran representación en la base de datos de poblaciones actuales la disyuntiva autenticidad-contaminación resulta aún más difícil de evaluar. En estos casos también fueron descartadas *a priori* aquellas secuencias con más de una posición ambigua no clonadas. Al no ser incluidas tales secuencias parciales en el análisis filogenético final, la aceptación por error de una secuencia contaminada por *carry over* no influye tanto en el resultado final.

Tabla R44. Representación de los haplotipos de las muestras antiguas en la base de datos de secuencias actuales diseñada para la presente tesis doctoral. Fragmento 1: posiciones 16126-16258; Fragmento 2: posiciones 16258- 16369; 1+2: Posiciones 16126-16369. Si: Haplotipo presente en la base de datos. No: Haplotipo ausente en la base de datos. Aquellos haplotipos no representados se señalan en negrita.

Muestra	Fragmento 1			Fragmento 2			1+2		
	Haplotipo	Base datos		Haplotipo	Base datos		Haplotipo	Base datos	
AB5	CRS	Si		CRS		Si	CRS		Si
AB9	16126C	Si		16311C		Si	16126C, 16311C		Si
ABI3	CRS	Si							
ABI4	16129R,16172Y,16223Y	No		16261T,16278T,16294T,16309G		Si	16129R,16172Y,16223Y,16261T,16278T,16294T,16309G		No
ABI5	16129R,16142Y,16172Y,16223Y	No		CRS		Si	16129R,16142Y,16172Y,16223Y		No
AB17(1)	16256T	Si		CRS		Si	16256T		Si
AB20	16215G,16227R	No							
2TM1	16256Y	Si		16266Y,16294Y,16304Y,16311Y		No	16256Y,16266Y,16294Y,16304Y,16311Y		No
1TM2	CRS	Si		16261T,16278T,16294T,16309G		Si	16261T,16278T,16294T,16309G		No
2TM4(1)	16224C	Si		CRS		Si	16224C		Si
1TM5	16126C	Si		16311C		Si	16126C, 16311C		Si
1TM6	CRS	Si		16261T,16278T,16294T,16309G		Si	16261T,16278T,16294T,16309G		No
TM11	CRS	Si		16261T,16278T,16294T,16309G		Si	16261T,16278T,16294T,16309G		No
AT18	CRS	Si		16286S		No	16286S		No
AT19				CRS		Si			Si
AT27				16320T		Si			Si
GA22	CRS	Si		16239T,16242T		Si	16239T,16242T		Si
2NE	16126C	Si		16286S,16311Y,16362Y		No	16126C,16286S,16311Y,16362Y		No
3NE	16193T	Si		16286T		Si	16193T,16286T		No
4NE	16129Z	Si		16264T,16270T,16278T,16293G,16311C		Si	16129Z,16264T,16270T,16278T,16293G,16311C		No
5NE	16126Y	Si		16264T,16270T,16278T,16293G,16311Y		Si	16126Y,16264T,16270T,16278T,16293G,16311Y		No
1P1	16182C,16183C,16189C	Si		16294Y,16296Y,16304Y		Si	16182C,16183C,16189C,16294Y,16296Y,16304Y		No
2P1	CRS	Si		CRS		Si	CRS		Si
CA7				16304C		Si			Si
TO1	16223T	Si		CRS		Si	16223T		Si
TH2	16224C	Si		CRS		Si	16224C		Si
TH4	16224C	Si							
TH5	CRS	Si		16311C		Si	16311C		Si
TH6				16311Y		Si			Si
TH8				CRS		Si			Si
2H9				16304Y		Si			Si

Tabla R44. (Continuación).

Muestra	Fragmento 1		Fragmento 2		1+2	
	Haplotipo	Base datos	Haplotipo	Base datos	Haplotipo	Base datos
2H11	CRS	Si				
3H11	CRS	Si				
H12	CRS	Si	16266T,16294T,16304Y	No	16266T,16294T,16304C	No
2H13	CRS	Si				
1H14	CRS	Si	16304Y	Si	16304Y	Si
1H15	16223Y	Si	CRS	Si	16223Y	Si
1H17	16224C	Si	CRS	Si	16224C	Si
1H18	CRS	Si				
2H20	16223T	Si	16261Y,16278T,16294T,16309G	Si	16223T,16261Y,16278T,16294T,16309G	Si
1H21	CRS	Si				
1H24			16294T,16304C,16320T	Si		
2H25			16327T	Si		
1H28			CRS	Si		
1H2			16311C	Si		
2H31			16261T,16278T,16294T,16309G	Si		
1H32			16311C	Si		
1H33			16311C	Si		
TR7	16224C	Si				
TR8	16147A	No				
TR9			16293C	No		
TR11			16293C	No		
TR12	16224C	Si	16311C	Si	16224C,16311C	Si
TR14	16224Y	Si	16270Y	Si	16224Y,16270Y	Si
TR16	16224C	Si	16311C,16366T	Si	16224C,16311C,16366T	Si
TR18	16224C	Si	16311C,16366T	Si	16224C,16311C,16366T	Si
TR19	16224C	Si	16298C,16325C,16327T	Si	16224C,16298C,16325C,16327T	No
DJ1	16218Y	Si	16264Y,16270T,16278Y,16294Y,16304Y,16311Y,16320Y	No	16218Y,16264Y,16270T,16278Y,16294Y,16304Y,16311Y,16320Y	No
DJ3			CRS	Si		
IDJ4			16261Y,16278Y,16311Y	Si		
IDJ6			CRS	Si		
2DJ6			CRS	Si		

Tabla R44. (Continuación).

Muestra	Fragmento 1		Fragmento 2		1+2	
	Haplotipo	Base datos	Haplotipo	Base datos	Haplotipo	Base datos
1MA1	16256T	Si	16297C	Si	16256T,16297C	No
2MA2	CRS	Si	16356C	Si	16356C	Si
1MA3	16129R,16192Y,16223Y	No	CRS	Si	16129R,16192Y,16223Y	No
1MA4	CRS	Si				
2MA4(1)	CRS	Si				
1MA5	16223T	Si	16356C	Si	16223T,16356C	No
1MA6	CRS	Si				
1MA8			CRS	Si		
2MA10	16223T	Si	CRS	Si	16223T	Si
3MA11	16126C	Si	16145A,16231C,16356C	Si	16126C,16145A,16231C,16356C	Si
1MA12	16223T,16256T	Si	16261T,16278T,16294T,16309G	Si	16223T,16256T,16261T,16278T,16294T,16309G	No

5.2.2.4. Eliminación de aquellas secuencias con más de una posición ambigua

De las secuencias que restan –tras eliminar aquellas inconsistentes entre diferentes amplificaciones de un mismo o de diferentes extractos (**Tabla R39**) y las coincidentes con alguno de los investigadores (**Tabla R43**)– 22 presentan alguna posición con doble nucleótido (18.96%). Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, la presencia de posiciones con doble nucleótido responde a la coexistencia de secuencias de diferente naturaleza en el extracto de DNA. Esto puede explicarse a través de dos fenómenos no excluyentes: la contaminación (de extracción, de amplificación o de *carry over*) no detectada en los controles y el daño molecular. Por otra parte, el proceso conocido como “*jumping PCR*” puede generar secuencias quiméricas a partir de diferentes trozos de DNA endógeno y DNA contaminante.

De las 22 secuencias con doble nucleótido, 8 presentan más de una posición ambigua, las correspondientes al primer segmento de las muestras: AB14, AB15 y 1MA3 y al segundo de 2TM1, 2NE, 1PI, DJ1 y DJ4. Estas ambigüedades pudieron resolverse mediante la clonación de los productos de amplificación en las muestras 2NE, 1PI y DJ1 tal y como se describe y discute en el apartado 5.2.2.5 de este capítulo. Ante la imposibilidad de determinar en las restantes secuencias no clonadas el número de tipos mitocondriales y determinar su origen se procedió directamente a su eliminación. Merece la pena sin embargo ahondar en el origen de estos haplotipos basándose en su frecuencia en la población actual y comparándolos con los de los investigadores y/o arqueólogos implicados en su obtención y con aquellos obtenidos en su mismo grupo de amplificación y/o reamplificación, como ya se había hecho para las inconsistencias entre diferentes amplificaciones (apartado 5.2.2.2.).

La **muestra AB14** presenta tres sustituciones con doble nucleótido únicamente en el primero de los dos segmentos de mtDNA secuenciados. El haplotipo formado por estas tres posiciones no fue encontrado en la base de datos Concordance de 6042 individuos de todo el mundo (MILLER *et al.* 1996) ni en la base de datos interna de 2839 individuos europeos y africanos (**Tabla R44**). Únicamente el haplotipo 129A-223C-261T-278T-294T-309G aparece en un individuo Yoruba de Nigeria en la relación de haplotipos de WATSON *et al.* 1997. La **muestra AB15** exhibe el mismo patrón mutacional en el primer segmento con una mutación ambigua adicional, la transición

16142C-T, aunque ambas muestras son distintas en el segundo segmento amplificado. El haplotipo completo tampoco está presente en ninguna de las dos bases de datos analizadas, sin embargo el haplotipo parcial del segundo segmento (261T-278T-294T-309G) aparece en algunas muestras antiguas de otros yacimientos: los individuos 1TM2, TM6 y TM11 del yacimiento contemporáneo navarro de Tres Montes y 2H20 y 2H31 del yacimiento neolítico de Siria de Tell Halula. Ambas secuencias proceden del mismo grupo de amplificación y reamplificación, del que también se obtuvieron secuencias de las muestras AB13 y 1TM2 (**Tabla R45**). La presencia de mutaciones ambiguas únicamente en AB14 y AB15 hace pensar que podría haberse producido contaminación por *carry over* en ambas muestras. Por otra parte, puesto que las secuencias de AB13 y 1TM2 son iguales a la secuencia del investigador I1, y a su vez de la secuencia consenso, también sería posible que hubiera tenido lugar una contaminación de amplificación no detectada en los blancos. De ser cierta esta última posibilidad, habría que asumir que las diferencias respecto a la secuencia consenso de las secuencias de AB14 y AB15 son endógenas a las muestras. Ante la imposibilidad de discernir entre una u otra explicación, ambas secuencias fueron eliminadas por precaución.

La **muestra 2TM1** presenta 3 posiciones con doble nucleótido en el segundo segmento del mtDNA. Ni el haplotipo completo de esta muestra ni aquel formado por estas tres sustituciones fue encontrado en ningún individuo de las dos bases de datos analizadas. Ninguna muestra de la misma serie de amplificación o reamplificación (**Tabla R45**) o de series temporalmente próximas presenta un patrón mutacional semejante, por lo que la presencia de dobles nucleótidos no puede explicarse a través de *carry over*. Podría tratarse de una contaminación puntual de la muestra, perteneciendo por tanto las mutaciones al individuo y la secuencia consenso al investigador, o de un fenómeno de *jumping PCR*. La presencia de daño molecular resulta, por otra parte, improbable ya que el resultado de cuantificación por *Real Time PCR* estableció que había un número de copias iniciales de $3,18 \times 10^4$, valor que supera ampliamente el umbral de 1000 copias por debajo del que se manifiestan sus efectos en la secuencia directa final (HANDT *et al.* 1996).

La secuencia parcial del segundo segmento de la **muestra DJ4** presenta tres sustituciones ambiguas (261T-278T-311C). Este haplotipo parcial consta en nuestra

base de datos de poblaciones actuales aunque no aparece en ninguna otra secuencia antigua recuperada. Las mutaciones 16278T y 16311C sí están en 1DJ1 de su mismo grupo de amplificación así como las sustituciones 16278T y 16261T en el individuo 1MA12, también del mismo grupo. Otras tres secuencias del mismo yacimiento y pertenecientes al referido mismo grupo de amplificación y reamplificación: DJ3, 1DJ6 y 2DJ6, son idénticas a la secuencia consenso. Como en el caso anterior podría tratarse tanto de una contaminación por *carry over* como de una contaminación de este grupo de amplificación por parte del investigador no detectada en los blancos.

La secuencia del primer segmento de la **muestra 1MA3** presenta tres posiciones con doble nucleótido. Este haplotipo no consta en nuestra base de datos ni tampoco en la relación de RICHARDS *et al.* 2000. La otra secuencia del mismo grupo de amplificación (**Tabla R45**) presenta una secuencia igual a la secuencia del investigador II, por lo que las posiciones con doble nucleótido podrían responder a una contaminación de dicho investigador sobre el grupo de amplificación, no detectada en los correspondientes controles. Los niveles de cuantificación obtenidos para esta muestra (5.53×10^4) hacen que la influencia del daño molecular en el resultado final sea improbable.

Aquellas posiciones para las que existe información de ambas cadenas de DNA aparecen marcadas en negrita. (*) Secuencias inconsistentes entre diferentes amplificaciones.

[illegible]

Tabla R45. (Continuación)

				1																												
Grupo amplificación	Muestra	PCR1	PCR2	6																												
				T	G	C	A	T	A	T	C	A	C	T	A	C	C	C	C	C	C	C	C	T	A	C	A	T				
33	AB20	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	HI2	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	AB9	+	+	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	IHI4	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
34	2TM4	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	2NE	?	+	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	3NE	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	4NE	?	+	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
35	5NE	?	+	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	1P1	?	+	.	.	.	.	.	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	2P1	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	F85	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
36	F83	?	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	TR8	+	+	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	TH4	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	TR7	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
37	TR12	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
	IHI4	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.			
	2H9	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.			
	HI2	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	Y	.	.	.	.			
38	AT15	-	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	Y	Y	.	.	.		
	AT16	-	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	T	Y	Y	.	.	.			
	AT18	-	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	AT25	-	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	Y		
	GA22	-	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	GA24	-	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	T	Y	C	.	T	.	.

Las muestras AB20, 2TM1, AT18, 4NE, 5NE, TH4, TH6, 2H9, 1H12, 1H14, 1H15, 2H20, TR14 y DJ1 presentan una sustitución con doble nucleótido en uno o en ambos segmentos del mtDNA analizados. La clonación de los productos de amplificación de las muestras 1H12, 2H20, TR14 y DJ1 permitió resolver algunas de estas ambigüedades, tal como se describe en el apartado 5.2.2.5.

La secuencia del primer segmento de la **muestra AB20** tiene dos mutaciones, una de ellas con doble nucleótido. El haplotipo parcial formado por ambas sustituciones no está presente ni en nuestra base de datos (**Tabla R44**) ni en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000. Tampoco aparece ni en las secuencias de su mismo grupo de amplificación ni en el resto de secuencias antiguas obtenidas. El daño molecular puede descartarse, ya que el número inicial de moléculas *template* de esta muestra supera la décima de millar (**Tabla R11**). Aparte de la singularidad de este haplotipo parcial, no existen razones para descartar esta secuencia.

En la secuencia del primer fragmento de la **muestra 2TM1** hay una posición con doble nucleótido presente de forma no ambigua en la muestra AB17 de su mismo grupo de amplificación (**Tabla R45**). Esta mutación no aparece, sin embargo, en la tercera secuencia del grupo, idéntica a la secuencia consenso. La amplificación de la muestra AB17 fue repetida con idéntico resultado, lo que prueba su autenticidad. Por lo tanto la contaminación por *carry over* de este grupo de amplificación puede ser descartada. La potencial contaminación que hubiera podido darse durante la amplificación de este grupo, sin haberse detectado en los controles, resulta asimismo improbable. Si así fuera, la secuencia de AB17 exhibiría un doble pico en la posición 16256. Otra posibilidad es que el extracto de 2TM1 contenga moléculas de DNA de diferente origen. A este respecto es interesante señalar que son ambiguos los tres cambios que caracterizan el segundo fragmento recuperado de esta muestra. Podría tratarse de una contaminación a este nivel por el investigador I1, que realizó las extracciones, con lo que los cambios observados corresponderían a la muestra en cuestión. Sin embargo, esta contaminación no puede probarse pues no hay rastro en el correspondiente control de extracción ni en las secuencias de las muestras extraídas junto con 2TM1 (AB20,1TM2, 1TM4,1TM5,1TM6 y TM11). Ante la ausencia de razones de peso para descartar la secuencia de 2TM1, ésta fue considerada auténtica e incluida en el análisis filogenético y estadístico.

La **muestra 4NE** presenta una mutación con doble nucleótido en el primer fragmento. Considerando la información del segundo fragmento, el haplotipo completo no consta en ninguna de las dos bases de datos analizadas. No obstante, su patrón mutacional permite enmarcarlo dentro del haplogrupo L1, hoy localizado en África. Ninguna de las secuencias obtenidas en la misma serie de amplificación exhibe esta sustitución (**Tabla R45**), por lo que cabría descartar el *carry over* como fenómeno responsable de la presencia de doble nucleótido. A pesar de que la posición 16129 es hipermutable *in vivo*, no presenta una de las tasas más elevadas de daño molecular *post mortem* (GILBERT *et al.* 2003a). Por ello, y porque los niveles de cuantificación de esta muestra superan en este caso la decena de millar (**Tabla R11**), parece improbable que el doble pico se deba a daño molecular. Teniendo en cuenta lo anterior, se consideró que la mutación era endógena a la muestra y el haplotipo completo fue incluido en el análisis filogenético y estadístico.

El primer fragmento de la **muestra 5NE** exhibe una única mutación con doble nucleótido, común a otra muestra (2NE) de su mismo grupo de amplificación y reamplificación (**Tabla R45**). De haberse producido *carry over* éste debería haber afectado también al resto del grupo de amplificación y no a una única muestra. La posición 16126C es una de las más mutadas tanto *in vivo* como *post-mortem* (GILBERT *et al.* 2003a). Ahora bien, de nuevo aquí el número inicial de moléculas de DNA *template* es demasiado elevado como para considerar la mutación como manifestación del daño molecular. El segundo segmento de la misma muestra presenta cinco mutaciones, de las cuales sólo una con doble nucleótido (16311). El haplotipo parcial reproducido aquí es idéntico al de la muestra 4NE.

La secuencia correspondiente al primer fragmento de la **muestra TH4** tiene una mutación ambigua, presente también en otros dos individuos de su misma serie de amplificación (TR7 y TR12) pero no en TR8 (**Tabla R45**). Teóricamente podría tratarse de una contaminación por *carry over* que hubiera afectado a la mayoría de las muestras de este grupo de amplificación. No obstante, el motivo 16224C es común en el yacimiento de Tell Halula y aparece en otros individuos como TH2 o H17. Los niveles de cuantificación de este extracto tampoco induce a pensar que el doble nucleótido pueda ser resultado de la reproducción del daño molecular presente en las cadenas de

DNA *template*. Por estas dos últimas razones la secuencia de TH4 fue considerada auténtica aunque al ser parcial no fue incluida en el análisis estadístico y filogenético.

En el segundo fragmento de la **muestra TH6** hay una única mutación ambigua, en la posición 16311. Como puede apreciarse en la **Tabla R45** esta secuencia es única en su grupo de amplificación y reamplificación. Una amplificación realizada a partir de otro extracto del mismo individuo (TH5, individuo H7) produjo una secuencia idéntica y no ambigua. Esto lleva a considerar como auténtica la secuencia derivada de TH6.

La secuencia del segundo fragmento de la **muestra 2H9**, caracterizada por una única mutación ambigua en la posición 16304, coincide con la de la **muestra 1H14** de su mismo grupo de amplificación. Este mismo cambio está presente, también, en la otra muestra de esta misma serie, H12, aunque en este caso va acompañado de otras dos sustituciones no ambiguas (**Tabla R45**). Este patrón puede ser compatible con tres situaciones diferentes. Podría tratarse, en primer lugar, de una contaminación de esta serie por parte del investigador I1 durante la amplificación no detectada en los respectivos blancos. Dado que la secuencia del investigador I1 es idéntica a la secuencia consenso, de haberse contaminado, el cambio 16304C sería endógeno de las muestras 2H9 y 1H14. Esta situación no permite explicar la presencia de un doble pico en esta misma posición en la secuencia de H12. Si asumiéramos que la secuencia ha sido también contaminada por el investigador I1, habría doble nucleótido en aquellas posiciones en las que la secuencia endógena difiriera de la secuencia consenso. Sin embargo, de las tres mutaciones presentes en la secuencia de H12 sólo la posición 16304 es ambigua. La segunda explicación es que las tres secuencias hayan resultado contaminadas por el haplotipo 16304C. Si así fuera, la secuencia endógena de 2H9 y 1H14 sería igual a la secuencia consenso mientras que la secuencia de H12 sería 16266T, 16294T. La clonación del producto de amplificación de esta última muestra reveló la existencia de un único motivo mitocondrial en la secuencia final, en el que aparecían las tres mutaciones 16266T, 16294T y 16304C, por lo tanto el *carry over* tampoco explica el patrón mutacional observado en este grupo de amplificación. La tercera posibilidad, el daño molecular en las cadenas de DNA *template*, puede ser excluida directamente al ser el número de copias superior al millar en las tres muestras (**Tabla R11**). Ya que no hay razones sólidas para descartar las secuencias de este grupo de amplificación, se consideraron válidas todas ellas.

La única posición ambigua del primer fragmento de la **muestra 1H15** aparece, asimismo, en otra muestra de su mismo grupo de reamplificación (2H20) y en otras dos muestras de su grupo de amplificación (AB14 y AB15). Ni el *carry over* ni la contaminación por parte del investigador I1 permiten explicar este resultado, dada la heterogeneidad de las secuencias de ambos grupos. Por otra parte, el haplotipo completo de esta secuencia, formado por esta única transición, es de los más comunes en población actual y está representado en otras muestras antiguas del conjunto. A pesar de que la posición 16223 está designada como un *hot-spot* de daño molecular (GILBERT *et al.* 2003a) la elevada estima de cuantificación de moléculas de DNA *template* iniciales en este extracto (**Tabla R11**) permite descartar la incidencia de daño molecular en las amplificaciones derivadas del mismo. En consecuencia, la mutación 16223T fue considerada endógena a la muestra 1H15 y la secuencia completa incluida en el análisis estadístico y filogenético.

La secuencia recuperada de la **muestra AT18** presenta una sola mutación con doble nucleótido, también única en su grupo de amplificación. Este tipo de cambio, transversión de C a G, es muy poco frecuente en población actual (MALYARCHUK *et al.* 2002). El haplotipo de esta muestra no aparece en la base de datos de secuencias de población actual muestreada. Tampoco está presente en ninguna de las secuencias de sus grupos de amplificación ni de reamplificación, todas las cuales, a excepción de GA22, resultaron contaminadas durante la extracción por el investigador I2 (ver apartado 5.2.2.3.1. para mayor detalle). Puesto que no existe ninguna razón para dudar de esta secuencia, fue considerada auténtica e incluida en el análisis estadístico y filogenético.

5.2.2.5. Clonación bacteriana de los productos de amplificación y secuenciación de múltiples clones

5.2.2.5.1. Secuencias obtenidas

En la **Tabla R46** se detallan el número de clones obtenidos de las diferentes amplificaciones clonadas.

Tabla R46. Número de clones obtenidos de cada uno de los dos segmentos del conjunto de amplificaciones clonadas.

Procedencia	Individuo	Muestra	Número de clones		
			Primer segmento	Segundo segmento	Total
Dja'de	SK-A2	1DJ1	4	5	9
Nerja	NE-NT79	3NE	4	3	7
Nerja	NE-NM82.2	2NE	4	4	8
Mari	12	1MA12	3	3	6
Muge	TAS 216	TA3	4	0	4
El Pirulejo	1PI	1PI	8	7	15
Tell Halula	H-68	H12	1	3	4
Tell Halula	H-37	2H20	3	2	5
Tell Ramad	R65-14	TR12	2	3	5
Tell Ramad	R69(2)	TR14	4	3	7
Tell Ramad	R66-N4-400	TR19	3	5	8
Toledo	K-13	TO1	4	3	7
Tres Montes	TM-11	1TM6	4	3	7
Total			48	44	92

En las **Tablas R47-R60** se comparan las secuencias obtenidas a partir de los diferentes clones y por secuenciación directa (DIR) respecto a la secuencia consenso (*CRS*). Los clones se designan con el nombre de la muestra seguido por el fragmento clonado (1 ó 2) y finalmente por el número de clon. A partir de la información de los clones y de la secuenciación directa se reconstruyó una secuencia consenso para cada una de estas muestras (**Tabla R61**). Para ello sólo se consideraron aquellas sustituciones presentes en la secuencia directa y en la mayoría de los clones obtenidos, así como aquéllas presentes en la totalidad de los clones aunque no estuvieran en la secuencia directa.

Tabla R47. Secuencias de los clones de DJ1.

[illegible]

Tabla R48. Secuencias de los clones de 2NE

[illegible]

Tabla R49. Secuencias de los clones de 3NE

[illegible]

Tabla R50. Secuencias de los clones de 1MA12

[illegible]

Tabla R51. Secuencias de los clones de TA3

[illegible]

Tabla R52. Secuencias de los clones del primer fragmento de 1 P

[illegible]

Tabla R53. Secuencias de los clones del segundo fragmento de 1P1.

[illegible]

Tabla R54. Secuencias de los clones de 1H12

[illegible]

Tabla R55. Secuencias de los clones de 2H20.

[illegible]

Tabla R56. Secuencias de los clones de TR12

[illegible]

Tabla R57. Secuencias de los clones de TR14.

[illegible]

Tabla R58. Secuencias de los clones de TR19.

[illegible]

Tabla R59. Secuencias de los clones de TO1

[illegible]

Tabla R60. Secuencias de los clones de lTM6

[illegible]

Las secuencias de los clones de las muestras H12, 2H20, TR12, 1TM6 y 1MA12 resultaron idénticas a la secuencia obtenida de forma directa. Las de los clones de la muestra TR19 presentan igualmente las mismas mutaciones de la secuencia directa, aunque uno de ellos, el clon TR19-2.3, incorpora, además, tres transiciones puntuales no compartidas ni por el resto de los clones ni por la secuencia directa.

En la totalidad de clones de la muestra DJ1 hay la sustitución 16294 T→C, la cual aparece en la secuencia directa como posición ambigua. Las transiciones 16218 C→T, 16304 T→C y 16320 C→T de la secuencia directa están presentes en tres de los cuatro clones secuenciados, por lo que también fueron consideradas a la hora de reconstruir la secuencia consenso. En cambio, las mutaciones de la secuencia directa: 16264 C→T, 16270 C→T y 16278 C→Y no están representadas en ninguno de los clones secuenciados, por lo que no fueron tenidas en cuenta a este respecto. La transición 16311 T→C, presente como posición ambigua en la secuencia directa, sólo aparece en uno de los clones, por lo que tampoco fue considerada. Adicionalmente, uno de los clones exhibe una sustitución puntual en la posición 16250 no compartida por ninguna de las otras secuencias.

En la muestra 2NE pudo confirmarse la sustitución 16126 T→C, presente tanto en los clones como en la secuencia directa. Sin embargo, ni la transversión 18186 C→S ni la transición 16362 C→Y presentes en la secuencia directa aparecen en ninguno de los 4 clones obtenidos. La ambigüedad detectada en la posición 16311Y de la secuencia directa no pudo ser resuelta gracias a la clonación, pues dos de los clones tenían la sustitución T→C en esta posición mientras que los dos restantes no, permaneciendo como Y en la secuencia consenso reconstruida.

En la otra muestra de Nerja, 3NE, pudo confirmarse una de las sustituciones presentes en la secuencia directa, la transición 16192 C→T, pero no la otra, la transición 16286 C→T, ausente en los clones obtenidos. En cambio, la clonación reveló la existencia de otra mutación no presente en la secuencia directa, la transición 16311 T→C, que naturalmente se incluyó en la secuencia consenso.

En la muestra TA3 la clonación sirvió para confirmar una de las mutaciones presentes en la secuencia directa (16126 T→C). Sin embargo, la transición 16192 C→T, presente también en la secuencia directa, sólo apareció en uno de los cuatro clones obtenidos. Por este motivo no fue considerada en la secuencia consenso.

De las dos mutaciones de la secuencia directa de la muestra TR14: 16224 T→C y 16270 C→T la clonación confirmó únicamente la primera. Esta transición aparece en tres de los cuatro clones secuenciados y pasó a ser tomada en cuenta en la reconstrucción de la secuencia consenso. La segunda mutación sólo aparece en la secuencia directa y por tanto no fue aceptada. Todas las secuencias de los clones de esta misma muestra comparten la transversión 16293 A→C que, paradójicamente, no aparece en la secuencia obtenida de forma directa. Esta mutación y la primera de las transiciones antes mencionadas fueron incluidas en la secuencia consenso.

El cambio 16223 C→T, presente en la secuencia directa de la muestra TO1, está también en tres de los cuatro clones obtenidos, y fue por ello mantenido en la secuencia consenso de esta muestra. El otro clon, sin embargo, muestra una sustitución en la posición siguiente (16224 T→C) que, al no aparecer en ninguno de los otros clones ni en la secuencia directa, no fue considerado.

De las mutaciones presentes en la secuencia directa de la muestra de El Pirulejo (1PD): 16182A→C, 16183A→C, 16189T→C, 16294 C→Y, 16296 C→Y y 16304 T→Y sólo pudieron confirmarse, mediante clonación, las tres primeras, presentes en la totalidad de los clones. Las tres sustituciones provocan la formación de un tracto de poli-C que en algunos casos genera heteroplasmia de longitud entre diferentes variantes mitocondriales de una misma muestra, produciéndose inserciones y/o deleciones como resultado de errores de la polimerasa durante el proceso de replicación o durante la amplificación de las cadenas por *PCR* (HOWELL y SMEJKAL 2000). En este caso, dos de los clones obtenidos presentaban la inserción de una citosina entre las posiciones 16193 y 16194, y cinco de ellos una deleción en posición 16193. La secuencia del clon restante quedaba interrumpida a partir de la posición 16182, justo al inicio del tracto de poli-C y hasta la posición 16241. Adicionalmente, en esta muestra se observan un conjunto de sustituciones (16133 C→A, 16164 A→G, 16203 A→G, 16241 A→G,

5.2.2.5.2. Análisis de los resultados

Teniendo en cuenta la información de los clones y de la secuencia directa se detectaron un total de 65 cambios respecto a la secuencia consenso, de los cuales 63 son sustituciones en 28 posiciones diferentes de la región Hipervariable I del mtDNA y los dos restantes corresponden a una inserción y una delección. Veintisiete de estas posiciones variables se produjeron en la secuencia directa y en todos los clones, lo que supone un 38.46%. En 12 casos aparecieron mutaciones puntuales en algunos de los clones sin correspondencia con la secuencia directa (18.46%), y en 10 casos las mutaciones presentes en la secuencia directa no aparecieron representadas en ninguno de los clones (15.38%). En dos casos los clones permitieron identificar una mutación no presente en la secuencia directa (3.07%). Doce mutaciones presentes en la secuencia directa aparecían, también, en algunos de los clones (18.46%), de las cuales 10 fueron consideradas sustituciones auténticas. Ni la inserción ni la delección presentes en algunos de los clones fueron consideradas en la reconstrucción de la secuencia consenso.

5.2.2.6. Ensayos bioquímicos de preservación de otras macromoléculas de la misma muestra

Se ha estimado el contenido total de aminoácidos y la ratio D/L Asp de algunas de las muestras de las que se obtuvieron secuencias. Los resultados y su relación con la eficiencia de amplificación y la capacidad de recuperación de secuencias se detallan en el apartado 2.2.2.4. de este mismo capítulo. Dada la variabilidad observada en las ratios de D/L Asp el resultado no se tuvo en cuenta como criterio de autenticidad. Esta cuestión se tratará más detalladamente en el capítulo de discusión.

5.2.2.7. Cuantificación del número de moléculas de DNA template amplificable presentes en un extracto

De los 90 extractos que produjeron algún tipo de secuencia, 65 pudieron ser cuantificados mediante *Real Time PCR* (**Tabla R11**). En 63 de estos 65 casos (96.9%) la cuantificación reveló que el número de moléculas de DNA *template* en los extractos era superior a 10^3 copias. En los dos extractos restantes (SK106 y 1PI) el número de

moléculas de DNA iniciales no pudo ser calculado, probablemente a causa de la presencia en ellos de inhibidores de la *PCR* (ver apartado 4 de este mismo capítulo para mayor información). Por tanto, al menos teóricamente, en las secuencias directas derivadas de los 63 extractos cuantificados la posibilidad de que las mutaciones encontradas se deban a la reproducción del daño molecular en las cadenas de DNA *template* originales es bastante remota.

5.2.3. *Secuencias definitivas*

Tras descartar las secuencias descritas en el apartado 5.2.2., se disponía de otras 102 correspondientes a 67 individuos de 11 yacimientos arqueológicos. De estas 102 secuencias, 46 corresponden al primer fragmento de 133pb (posiciones 16126-16258), 52 al segundo segmento de 112pb (posiciones 16258-16369), 2 al fragmento corto de 109pb amplificado según el diseño de GARCÍA-BOUR *et al.* 2004 (posiciones 16284-16393) y 2 al fragmento largo de 234pb obtenido con este mismo diseño (posiciones 16159-16393).

Con la información de los segmentos de 133pb y 112pb se pudo reconstruir la secuencia de 244pb de 35 individuos (posiciones 16126-16369). Las secuencias resultantes se resumen en la **Tabla R62**.

Tabla R62. Secuencias autenticadas según lo descrito anteriormente. Sólo constan las posiciones en las que se detectaron sustituciones en, al menos, un individuo. El punto (·) indica la presencia del mismo nucleótido que en la secuencia de referencia ó *CRS* (ANDERSON *et al.* 1981). Los cambios respecto a ésta se indican según la nomenclatura de la IUPAC: C: citosina; T: timina; A: Adenina; G: Guanina; Y: C ó T; W: A ó T; S: G ó C; M: A ó C y R: A ó G. Las posiciones para las que existe información de ambas cadenas de DNA aparecen marcadas en negrita.

Procedencia	Individuo	Muestra	1																																		
			T	G	G	C	C	A	A	T	C	A	C	C	T	A	T	C	C	C	C	C	C	C	A	C	C	T	T	A	T	C	T	C	A	T	C
Abauntz	ABb1.1	AB5	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB23C	AB9	C	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB21D	AB13	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB17C	AB14	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB35F	AB15	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB35E	AB17	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Abauntz	AB25E	AB20	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	AX-6	AT18	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	AX-7	AT19	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	AX-15	AT27	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Atxuri	G22	GA22	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Caldeirao	O10 107	CA7	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Dja'de	SK-A2	DJ1	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Dja'de	SK-D4 16	DJ3	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Dja'de	SK-R3	1DJ6-2DJ6	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
El Pirulejo	1PI	1PI	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
El Pirulejo	2PI	2PI	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	1	1MA1	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	2	2MA2	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	3	1MA3	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	4	1MA4-2MA4	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	5	1MA5	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	6	1MA6	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Mari	8	1MA8	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·

Tabla R62. (Continuación).

Procedencia	Individuo	Muestra	CRS	1																											
				6																											
Mari	10	2MA10	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	11	3MA11	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Mari	12	1MA12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	NE-NM82.2	2NE	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Nerja	NE-NT79	3NE	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Nerja	NE-NAP	4NE	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Nerja	NE-1829	5NE	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Nerja	NE-NM82.2	2NE	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-3	TH2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-4	TH4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-7	TH5-TH6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-8	TH8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-24	1H24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-25	2H25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-28	1H28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-36	1H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-37	2H20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-43	2H31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-44	1H32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-45	1H17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-47	1H18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-48	1H33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-49	1H15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-53	1H14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-57	1H21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tell Halula	H-64	2H13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

[illegible]

5.2.3.1. Distribución de las mutaciones en los sitios variables y *hot spots* mutacionales

En la **Figura FR37** se representan el número de mutaciones en aquellas posiciones variables de las muestras antiguas. Como puede apreciarse claramente, y tal como ha sido observado por otros autores en estudios de población actual, la variabilidad dentro del segmento Hipervariable I (HVSI) no sigue un patrón al azar, sino que existen determinadas posiciones con una frecuencia de mutación más elevada que otras, posiciones denominadas *hot spots* o “puntos calientes” de mutación.

En la **Tabla R63** se muestran aquellos sitios que presentan dos o más sustituciones en el conjunto de las muestras estudiadas y se detalla la tasa de sustitución estimada para cada uno de ellos en tres estudios diferentes realizados en población actual (MALYARCHUK *et al.* 2002; MEYER *et al.* 1999; BANDELT *et al.* 2002).

Las diferencias en las posiciones rápidas entre los tres estudios se deben principalmente al número y procedencia de las secuencias a partir de las cuales se infirieron. El estudio de MEYER *et al.* 1999 incluye 1229 secuencias de todo el mundo, mientras que el de BANDELT *et al.* 2002 contiene 873 secuencias de individuos de Eurasia y África y el de MALYARCHUK *et al.* 2002 se basa únicamente en secuencias de Europa del este. Aunque las diferentes tasas de mutación no son comparables entre sí, pues han sido estimadas a partir de un diferente conjunto de datos y mediante metodologías diferentes, dan, con todo, una idea aproximada de qué posiciones mutan más rápidamente.

Figura FR37. Distribución de las mutaciones de las secuencias definitivas obtenidas del conjunto de muestras antiguas (frecuencias absolutas).

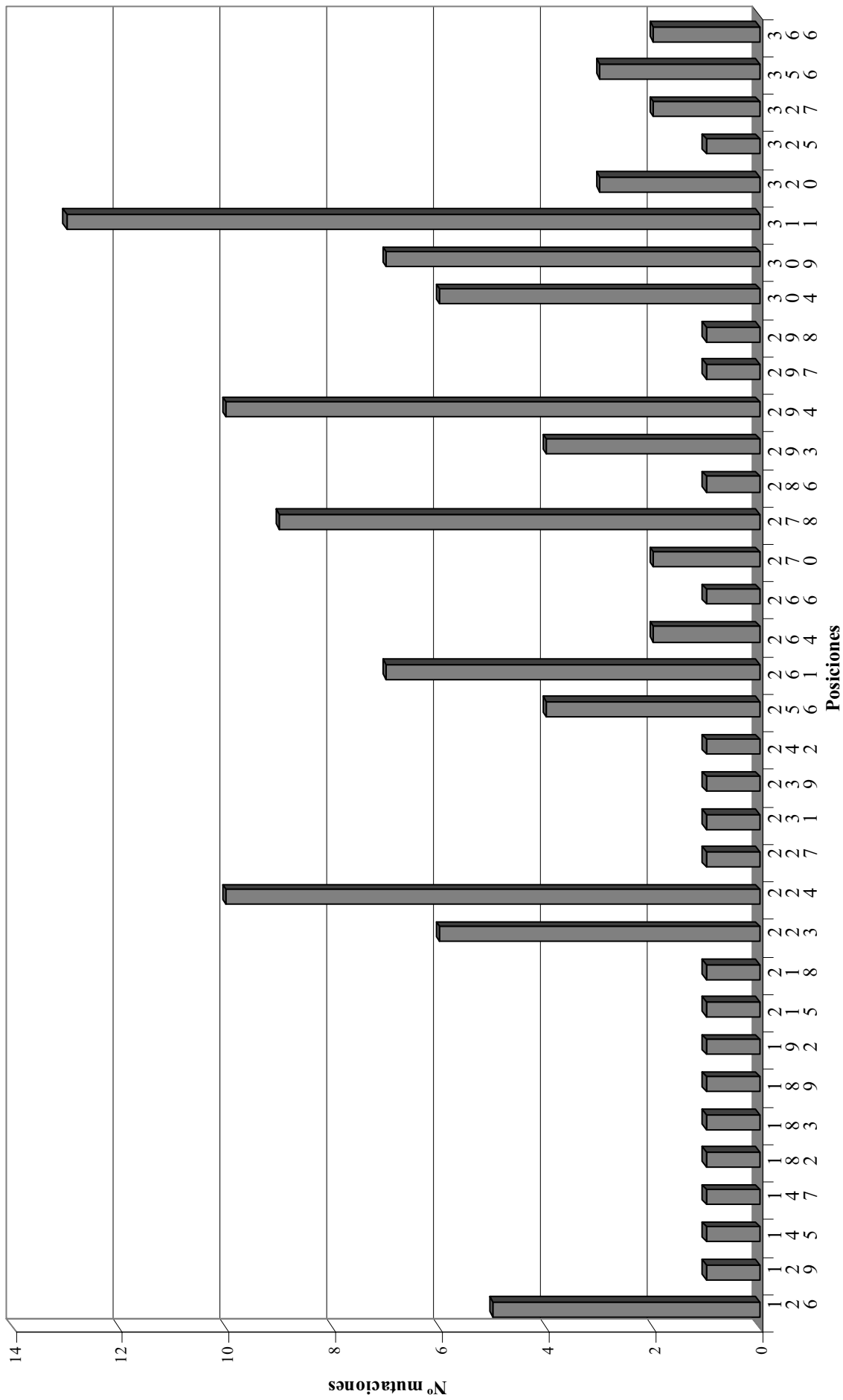


Tabla R63. Número y porcentaje de mutaciones de aquellas posiciones con más de dos sustituciones en el conjunto de muestras estudiadas y tasa de mutación estimada para cada una de ellas en tres estudios diferentes de población actual (MALYARCHUK *et al.* 2002; MEYER *et al.* 1999; BANDELT *et al.* 2002). En el estudio de Malyarchuk *et al.* 2002 se señalan directamente el número de mutaciones por posición.

Posición	Nº mutaciones	%	Tasa de mutación		
			Malyarchuk <i>et al.</i> 2002	Meyer <i>et al.</i> 1999	Bandelt <i>et al.</i> 2002
16311	13	14.28	22	4-5	29.5
16224	10	10.98	0	0	0
16278	9	9.89	17	4-5	12
16294	9	9.89	11	4-5	3
16261	7	7.69	12	2-3	11
16309	7	7.69	0	3-4	2.43
16223	6	6.59	0	4-5	9
16126	5	5.49	14	4-5	4.5
16304	5	5.49	16	0	6
16256	4	4.39	13	2-3	9
16270	3	3.29	0	0	2.5
16293	2	2.19	0	3-4	7
16356	3	3.29	0	0	2.5
16264	2	2.19	0	0	2
16320	2	2.19	0	2-3	8.47
16327	2	2.19	0	0	3
16366	2	2.19	0	0	0
Total	91	100			

Seis de las posiciones con una elevada frecuencia de mutación en población antigua presentan una elevada tasa de mutación según los tres estudios. Cuando se consideran únicamente los datos de MEYER *et al.* 1999 y BANDELT *et al.* 2002, el número asciende a 10, y es de 12 cuando se consideran sólo los resultados de BANDELT *et al.* 2002. Por lo general, hay correlación entre la frecuencia de mutación en cada posición y las tasas de mutación inferidas del mismo. Con todo, es sorprendente que la posición 16224, la segunda más mutada en la muestra antigua, no esté definida como un sitio de cambio rápido en ninguno de los tres trabajos. La causa más probable parece estar en la composición del conjunto de la muestra. Seis de las diez mutaciones que tienen lugar en la posición 16224 se han hallado en el yacimiento de Tell Ramad y otras tres en el yacimiento contemporáneo, geográficamente próximo de Tell Halula, pudiendo ser la explicación que pertenezcan a individuos emparentados por vía materna.

En el total de la muestra se han encontrado 113 mutaciones, distribuidas en 36 posiciones variables, la mayoría de ellas transiciones (85%), lo que concuerda con varios resultados obtenidos en población actual (BUDOWLE *et al.* 1999; LUTZ *et al.* 1998; MEYER *et al.* 1999; TAMURA 2000; VIGILANT *et al.* 1991 y MALYARCHUK *et al.* 2002). Entre las transiciones predominan las que se dan entre pirimidinas (87,8%), siendo la sustitución C→T el cambio predominante. Las tranversiones encontradas corresponden a los tipos A→C, C→A y C→G. En la **Tabla R64** se detallan el número de mutaciones y de sitios variables de cada tipo de cambio.

Tabla 64. Número y porcentaje de cada uno de los cambios posibles y número de sitios polimórficos que representan en el conjunto de secuencias antiguas definitivas.

Tipo cambio	Nº mutaciones	%	Posiciones variables
C→T	51	46.36	15
T→C	41	37.27	10
A→G	11	10	4
A→C	3	2.72	3
G→A	2	1.81	2
C→A	1	0.90	1
C→G	1	0.90	1
T→G	0	0	0
G→T	0	0	0
A→T	0	0	0
T→A	0	0	0
G→C	0	0	0
Total	110	100	36

Los porcentajes de los diferentes cambios son muy similares a los obtenidos por MALYARCHUK *et al.* 2002 en un fragmento de 274pb de la HVRI del mtDNA (posiciones 16092-16305).

6. ANÁLISIS POBLACIONAL

6.1. Índices de diversidad

6.1.1. Número y porcentaje de sitios polimórficos

En la Tabla **R65** se muestran el número y porcentaje de sitios variables o polimórficos (v) –(para definición consultar apartado 16.3.1. del capítulo “Métodos”)– de los fragmentos de 244pb, 133pb y 112pb analizados dentro de cada yacimiento y en diferentes subconjuntos de la población estudiada.

Tabla R65. Número (v) y porcentaje (%v) de posiciones variables calculadas en base al número de posiciones secuenciadas dentro de cada yacimiento, en el total de la población antigua, y en diferentes subconjuntos de la misma. Los valores fueron calculados en el fragmento total de 244pb (posiciones 16126-16369) y en los fragmentos parciales de 133pb (posiciones 16126-16258) y 112pb (16258-16369) por separado. N: Tamaño muestral.

Población	Tamaño del fragmento								
	244pb			133pb			112pb		
	N	v	%v	N	v	%v	N	v	%v
Abauntz	3	3	1.23	5	4	3.01	5	5	4.46
Atxuri	-	-	-	-	-	-	1	0	0
Caldeirão	-	-	-	-	-	-	1	0	0
Dja'de	1	0	0	1	0	0	3	3	2.68
El Pirulejo	2	3	1.23	2	3	2.26	2	0	0
Garaí	-	-	-	-	-	-	1	0	0
Mari	6	11	4.51	8	5	3.76	8	6	5.36
Nerja	4	7	2.87	4	3	2.26	4	4	3.57
Tell Halula	7	9	3.69	12	2	1.50	16	9	8.04
Tell Ramad	6	8	3.28	7	2	1.50	7	6	5.36
Toledo	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Tres Montes	5	7	2.87	6	3	2.26	5	5	4.46
Neolítico	30	26	10.66	41	11	8.27	48	18	16.07
Paleolítico	5	7	2.87	5	6	4.51	5	1	0.89
Neolítico PI	10	12	4.92	13	6	4.51	14	10	8.93
Neolítico PO	14	17	6.97	20	4	3.01	26	13	11.61
Población antigua	35	30	12.30	48	15	11.28	54	18	16.07

En las muestras en que pudo reconstruirse la secuencia completa de 244pb se detectaron 30 sitios variables, valor que disminuye cuando se consideran por separado los fragmentos de 133pb y 112pb. No obstante, el porcentaje de sitios variables, aumenta a medida que disminuye el tamaño del fragmento. Este valor es sensiblemente

superior en el fragmento de 112pb, lo que está relacionado con una mayor inestabilidad en esta región del Segmento Hipervariable I, debida a su mayor tasa de mutación.

El porcentaje de sitios variables está influido por el tamaño muestral (N) y por la longitud de la secuencia considerada. Ello explica que el porcentaje de sitios polimórficos resultante por yacimiento sea relativamente bajo. Por ejemplo, de la región de 244pb únicamente se ha conseguido secuenciar una sola muestra en los yacimientos de Toledo y Dja'de, respectivamente, siendo el número de sitios variables, en ambos casos, igual a 0. Cuando se agrupan las muestras por su cronología ("Neolítico" vs "Paleolítico") y/o procedencia ("Neolítico de Próximo Oriente" vs "Neolítico de la Península Ibérica") –(apartado 16.2, capítulo "Métodos")– este porcentaje aumenta, aunque el tamaño de la muestra "Paleolítico" es reducido (N=4). La representación muestral de la población "Neolítico de Próximo Oriente" es más diversa según este porcentaje que la de la "Península Ibérica" en los fragmentos de 244pb y 112pb, aunque en ninguno de ambos casos se aprecian diferencias significativas (Prueba de Fisher bilateral; $P=0.4443$ y $P=0.6606$, respectivamente).

La interpretación de los diferentes índices de diversidad, y de otras medidas de divergencia de las secuencias antiguas identificadas, necesita un marco de referencia para su comparación. Éste se ha elaborado con las secuencias de las mismas regiones de 38 poblaciones actuales de Europa, Próximo Oriente y África obtenidas de diferentes bases de datos, como se describe en el apartado 16.1 del capítulo "Métodos". En la **Tabla R66** se resumen el número y porcentaje de posiciones polimórficas para los fragmentos de 244pb, 133pb y 112pb en 38 poblaciones actuales y en cuatro subconjuntos de población antigua ("Neolítico", "Paleolítico", "Neolítico Próximo Oriente" y "Neolítico Península Ibérica"). Se presentan las poblaciones de mayor a menor según el porcentaje de sitios variables del fragmento de 244pb. En la parte final de la tabla se muestran también, aunque no ordenados, los valores globales de los conjuntos de población actual y población antigua, así como los de las poblaciones actuales europea, de Próximo Oriente y de África.

Tabla R66. Número (v) y porcentaje (%v) de posiciones variables, calculadas en base al número de posiciones secuenciadas, en 38 poblaciones actuales y en diferentes subconjuntos de población antigua, en fragmentos de 244pb, 133pb y 112pb. Las poblaciones se presentan ordenadas según el %v del fragmento de 244pb. Se señalan en **negrita** las poblaciones antiguas estudiadas.

Población	Tamaño del fragmento								
	244pb			133pb			112pb		
	N	V	%v	N	v	%v	N	v	%v
África O	427	105	43.03	427	61	45.86	427	44	39.29
Valle del Nilo	237	101	41.39	237	60	45.11	237	42	37.50
Rusia N Cáucaso	178	94	38.52	178	49	36.84	178	46	41.07
Noruega	216	83	34.02	216	43	32.33	216	40	35.71
África E	84	72	29.51	84	38	28.57	84	34	30.36
Turquía	70	68	27.87	70	37	27.82	70	31	27.68
Austria	100	66	27.05	100	35	26.32	100	31	27.68
Finlandia	146	57	23.36	146	29	21.80	146	29	25.89
Gran Bretaña	92	57	23.36	92	29	21.80	92	28	25.00
Jordania	42	56	22.95	42	33	24.81	42	23	20.54
Siria	49	56	22.95	49	27	20.30	49	29	25.89
Sicilia	62	53	21.72	62	30	22.56	62	23	20.54
Toscana	49	50	20.49	49	24	18.05	49	26	23.21
Canarias	54	47	19.26	54	21	15.79	54	21	18.75
Francia	50	47	19.26	50	23	17.29	50	24	21.43
Georgia	54	47	19.26	54	24	18.05	54	23	20.54
Galicia	90	45	18.44	90	29	21.80	90	16	14.29
Grecia	45	43	17.62	45	21	15.79	45	22	19.64
Italia Sur	37	42	17.21	37	18	13.53	37	24	21.43
Cerdeña	67	41	16.80	67	20	15.04	67	20	17.86
Albania	42	41	16.80	42	28	21.05	42	13	11.61
Alemania	48	39	15.98	48	17	12.78	48	22	19.64
Rusia Karelian	83	39	15.98	83	24	18.05	83	15	13.39
Portugal	54	37	15.16	54	21	15.79	54	16	14.29
Kurdistán	27	35	14.34	27	19	14.29	27	16	14.29
Bélgica	25	35	14.34	25	19	14.29	25	16	14.29
Bulgaria	30	33	13.52	30	16	12.03	30	17	15.18
Drusos Israel	45	30	12.30	45	17	12.78	45	13	11.61
País Vasco	45	29	11.89	45	16	12.03	45	13	11.61
Estonia	26	28	11.48	26	11	8.27	26	17	15.18
Andalucía	15	26	10.66	15	14	10.53	15	12	10.71
Neolítico	30	26	10.66	41	11	8.27	48	18	16.07
Saami	90	25	10.25	90	15	11.28	90	10	8.93
África C	29	24	9.84	29	16	12.03	29	9	8.04
Dinamarca	32	24	9.84	32	10	7.52	32	14	12.50
Suecia	25	17	6.97	25	11	8.27	25	6	5.36
Neolítico PO	14	17	6.97	20	4	3.01	26	13	11.61
Suiza	17	16	6.56	17	7	5.26	17	9	8.04
África S	19	15	6.15	19	10	7.52	19	5	4.46
Cataluña	15	14	5.74	15	7	5.26	15	7	6.25
Neolítico PI	10	12	4.92	13	6	4.51	14	10	8.93
Paleolítico	5	7	2.87	5	6	4.51	5	1	0.89
Europa	1787	169	69.26	1787	97	72.93	1787	73	65.2
Próximo Oriente	233	105	43.03	233	55	41.35	233	50	44.6
África	796	134	54.92	796	77	57.89	796	58	51.8
Población actual	2816	185	75.82	2816	104	78.2	2816	82	73.2
Población antigua	35	30	12.30	48	15	11.28	54	18	16.1

La mayor diversidad se encuentra en las poblaciones africanas del oeste y del Valle del Nilo, mientras que la menor corresponde a las poblaciones de Cataluña y África del Sur. Las diversidades de las cuatro subpoblaciones antiguas se sitúan entre las menores del conjunto. Como ya se ha comentado, el ordenamiento de las poblaciones responde sobre todo a su tamaño muestral, y se mantiene en los tres fragmentos analizados, lo que significa que, por sí mismo, este porcentaje no resulta de utilidad a la hora de comparar la diversidad de las poblaciones antiguas y la del conjunto de poblaciones actuales.

6.1.2. Haplotipos diferentes

En los 35 individuos de los que se obtuvo una secuencia de 244pb (posiciones 16126-16369) están representados 25 tipos mitocondriales diferentes (71.43%), de los cuales 20 son únicos (80%).

Los haplotipos compartidos corresponden, en dos casos, a individuos del mismo yacimiento. Así, el haplotipo 16224C-16311C-16366T está presente en dos muestras del yacimiento de Tell Ramad (TR16 y TR18) y el haplotipo 16261T-16278T-16294T-16309G en tres muestras del yacimiento de Tres Montes (1TM2, TM6, TM11). La particularidad de estos haplotipos (ver apartado 6.5.3.2. de este mismo capítulo) lleva a pensar que, probablemente, se trate de individuos relacionados por vía materna, sin olvidar que, si bien la información del segmento analizado es idéntica en estos individuos, la de otras regiones del mtDNA puede ser diferente.

Los restantes haplotipos compartidos aparecen en muestras de más de un yacimiento, como es el caso del motivo 16224C, presente en un individuo de Tres Montes (TM4) y en dos de Tell Halula (TH2 y 1H17). La secuencia 16223T está compartida por tres individuos procedentes de los yacimientos de Toledo (TO1), Tell Halula (1H15) y Mari (2MA10). Por su parte, la combinación 16126C-16311C caracteriza a un individuo de Abauntz (AB9), a uno de Tres Montes (1TM5) y a uno de Nerja (2NE), mientras que la secuencia consenso, la más común entre los europeos, aparece en un individuo de Abauntz (AB5) y en uno de El Pirulejo (2PI). La presencia de motivos poco comunes hoy en día, como el 16126C-16311C en yacimientos

temporal y/o geográficamente lejanos, responde a cuestiones complejas relacionadas con movimientos poblacionales que se tratarán con detalle en el apartado “Discusión”.

En la **Tabla R67** se muestran el número y porcentaje de haplotipos distintos (k y %k) (apartado 16.3.2., capítulo “Métodos”) de los fragmentos de 244pb, 133pb y 112pb obtenidos dentro de cada yacimiento y en diferentes subconjuntos de la población estudiada (apartado 16.2., capítulo “Métodos”).

Tabla R67. Número de haplotipos diferentes (k) y porcentaje de haplotipos diferentes (% k) calculado en base al número de individuos (N) de cada yacimiento, en el total de la población antigua, y en diferentes subconjuntos de la misma. Los valores fueron calculados en el fragmento total de 244pb (posiciones 16126-16369) y en los fragmentos parciales de 133pb (posiciones 16126-16258) y 112pb (16258-16369) por separado.

Población	Tamaño del fragmento								
	244pb			133pb			112pb		
	N	k	%k	N	k	%k	N	k	%k
Abauntz	3	3	100	5	4	80	5	3	60
Atxuri	-	-	-	-	-	-	1	1	100
Caldeirão	-	-	-	-	-	-	1	1	100
Dja'de	1	1	100	1	1	100	3	2	66.67
El Pirulejo	2	2	100	2	2	100	2	1	50
Garai	-	-	-	-	-	-	1	1	100
Mari	6	6	100	8	5	62.50	8	4	50
Nerja	4	4	100	4	3	75	4	2	50
Tell Halula	7	6	85.71	12	3	25	16	7	43
Tell Ramad	6	5	83.33	7	2	28.57	7	5	71.43
Toledo	1	1	100	1	1	100	1	1	100
Tres Montes	5	3	60	6	4	66.67	5	3	60
Población antigua	35	25	71.43	48	13	27.08	54	14	25.93
Neolítico	30	23	76.67	41	11	26.83	48	14	29.17
Paleolítico	5	5	100	4	4	100	4	2	50
Neolítico PI	10	7	70	13	6	46.15	14	6	42.86
Neolítico PO	14	12	85.71	20	5	25	26	10	38.46

La diversidad en el número de haplotipos diferentes por yacimiento es muy elevada debido al bajo tamaño muestral de la mayoría de ellos. Sin embargo esta tendencia se mantiene al agrupar los diferentes individuos por su cronología y/o procedencia. El número y porcentaje de haplotipos es superior en la muestra “Paleolítico” que en la “Neolítico”, aunque, tal y como sucedía para el número de sitios polimórficos, la causa es la reducida representación muestral de la primera de ellas. Cuando se distingue entre las poblaciones “Neolítico de Próximo Oriente” y “Neolítico

de la Península Ibérica, la variabilidad es superior en la primera de ellas, aunque las diferencias no son significativas según la Prueba de Fisher bilateral ($P=0.6146$).

El porcentaje de haplotipos diferentes disminuye cuando se analizan los dos fragmentos de 133pb y 112pb por separado. El resultado es lógico pues cuanto mayor es el fragmento analizado mayor es la probabilidad de encontrar diferencias entre dos secuencias determinadas.

Cuando se comparan estos índices con los obtenidos para las 38 poblaciones actuales de Europa, Próximo Oriente y África (**Tabla R68**) se observa que las poblaciones actuales con un mayor porcentaje de haplotipos diferentes son las de la región de Oriente Próximo (Siria, Jordania y Turquía), situándose inmediatamente a continuación la población Neolítica de esta misma región. La mayor variabilidad mitocondrial de las poblaciones de Próximo Oriente, en contraposición a la escasa variabilidad de la mayor parte de las poblaciones europeas, ha sido documentada ya en otros estudios (RICHARDS *et al.* 2000). Para estos autores, el hecho convierte a las poblaciones de Oriente Próximo en foco de origen de numerosas olas migratorias hacia Europa, iniciadas en el Paleolítico Superior, y que no cesarían hasta mucho después de la Edad de los Metales. Nuestros resultados indican que los niveles de variabilidad actual ya estaban presentes en el Neolítico. La variabilidad reducida del grupo *druso* de Israel seguramente se debe a su elevado grado de endogamia (ZLOTOGORA *et al.* 2003).

Tabla R68. Número (k) y porcentaje (%k) de haplotipos diferentes calculados en base al número de individuos (N) en 38 poblaciones actuales y en diferentes subconjuntos de población antigua en fragmentos de 244pb, 133pb y 112pb. Las poblaciones se presentan ordenadas según el %k del fragmento de 244pb. Se señalan en negrita las poblaciones antiguas estudiadas.

Población	Tamaño del fragmento								
	244 pb			133 pb			112 pb		
	N	K	%k	N	k	%k	N	k	%k
Paleolítico	5	5	100	5	5	100	5	2	40
Siria	49	44	89.8	49	28	57.14	49	29	59.2
Jordania	42	37	88.1	42	30	71.43	42	23	54.8
Turquía	70	60	85.71	70	36	51.43	70	33	47.1
Neolítico PO	14	12	85.71	20	5	25	26	10	38.5
Estonia	26	22	84.62	26	12	46.15	26	15	57.7
Bélgica	25	21	84	25	14	56	25	15	60
Suiza	17	14	82.35	17	7	41.18	17	9	52.9
África E	84	69	82.14	84	50	59.52	84	47	56
Francia	50	41	82	50	22	44	50	30	60
Italia Sur	37	30	81.08	37	15	40.54	37	25	67.6
Andalucía	15	12	80	15	11	73.33	15	10	66.7
Toscana	49	38	77.55	49	29	59.18	49	27	55.1
Neolítico	30	23	76.67	41	11	26.83	48	14	29.2
Canarias	54	40	74.07	54	30	55.56	54	23	42.6
Kurdistán	27	20	74.07	27	16	59.26	27	13	48.1
Bulgaria	30	22	73.33	30	14	46.67	30	15	50
Grecia	45	33	73.33	45	22	48.89	45	22	48.9
Albania	42	30	71.43	42	21	50	42	15	35.7
Georgia	54	38	70.37	54	23	42.59	54	24	44.4
Neolítico PI	10	7	70	13	6	46.15	14	6	42.9
Sicilia	62	43	69.35	62	29	46.77	62	24	38.7
Gran Bretaña	92	62	67.39	92	33	35.87	92	39	42.4
Cataluña	15	10	66.67	15	7	46.67	15	8	53.3
Portugal	54	36	66.67	54	22	40.74	54	17	31.5
Alemania	48	31	64.58	48	18	37.5	48	25	52.1
Austria	100	62	62	100	40	40	100	40	40
Valle del Nilo	237	139	58.65	237	105	44.3	237	94	39.7
Rusia N Cáucaso	178	104	58.43	178	59	33.15	178	68	38.2
Cerdeña	67	38	56.72	67	25	37.31	67	23	34.3
Dinamarca	32	18	56.25	32	11	34.38	32	13	40.6
País Vasco	45	24	53.33	45	15	33.33	45	16	35.6
Noruega	216	115	53.24	216	60	27.78	216	64	29.6
Rusia Karelian	83	43	51.81	83	27	32.53	83	19	22.9
África O	427	219	51.29	427	116	27.17	427	114	26.7
Druze Israel	45	22	48.89	45	16	35.56	45	13	28.9
Galicia	90	42	46.67	90	28	31.11	90	20	22.2
Finlandia	146	66	45.21	146	36	24.66	146	36	24.7
Suecia	25	11	44	25	7	28	25	7	28
África S	19	8	42.11	19	7	36.84	19	4	21.1
África C	29	11	37.93	29	10	34.48	29	8	27.6
Saami	90	21	23.33	90	12	13.33	90	11	12.2
Europa	1787	648	36.26	1787	300	16.79	1787	275	15.4
Próximo Oriente	233	157	67.38	233	91	39.06	233	78	33.5
África	796	432	54.27	796	241	30.28	796	216	27.1
Población actual	2816	1104	39.2	2816	523	18.57	2816	463	16.4
Población antigua	35	25	71.43	48	13	27.08	54	14	25.9

La población actual de menor porcentaje de haplotipos diferentes son los Saami. Otras poblaciones con elevado tamaño muestral y bajo porcentaje de haplotipos distintos son las del Valle del Nilo, Rusia Norte del Cáucaso, Noruega, África del Oeste, y Finlandia. Los Saami se caracterizan por presentar pocos linajes mitocondriales compartidos por muchos individuos (SAJANTILA *et al.* 1995), situación típica de poblaciones que han experimentado un cuello de botella seguido de aislamiento endogámico y geográfico.

El porcentaje de haplotipos de la muestra “Neolítico de la Península Ibérica” es intermedio, muy próximo a las poblaciones ibéricas actuales de Cataluña y Portugal pero, curiosamente, superior al descrito en la actual población vasca, este último uno de los temas candentes de la genética de poblaciones actuales. La otra población actual de la Península Ibérica aquí considerada, Andalucía, exhibe un porcentaje mayor de haplotipos, lo que podría deberse a su ascendencia norteafricana reciente (ARNAIZ-VILLENA *et al.* 1995), aunque lo más probable es que tales aportes provengan de diferentes épocas.

La muestra “Neolítico” presenta un porcentaje de haplotipos diferentes intermedio respecto al de las sub-poblaciones “Neolítico de Próximo Oriente” y “Neolítico de la Península Ibérica”.

6.1.3. Diversidad haplotípica

Como ya se ha descrito en el apartado 16.3.3. del capítulo “Métodos”, la diversidad haplotípica o diversidad genética de Nei ($\hat{H}$) se define como la probabilidad de que dos haplotipos escogidos al azar dentro de una muestra sean diferentes (NEI 1987). En consecuencia, la diversidad en un conjunto poblacional será máxima cuando todos los haplotipos sean diferentes, tal como sucede en los yacimientos de Abauntz o Nerja (**Tabla R69**), y disminuirá a medida que aumente el número de haplotipos compartidos.

Al igual que con el número y porcentaje de haplotipos diferentes, el tamaño muestral no afecta este índice, en principio. Sin embargo, cuando éste es muy bajo –

como en la muestra “Paleolítico”– resulta muy difícil concluir si la elevada diversidad encontrada es auténtica o un efecto de lo reducido de la muestra.

La diversidad haplotípica disminuye aquí, también, cuando se analizan por separado los fragmentos de 133pb y 112pb, aunque no tan marcadamente como sucedía con el porcentaje de haplotipos. Por lo general, la diversidad es mayor en el fragmento de 133pb. En cambio, la del fragmento de 112pb es mucho mayor en los yacimientos de Tell Halula y Tell Ramad. Ello se debe a que las sustituciones que definen los linajes de estas dos poblaciones se encuentran en este tracto (posiciones 16258→16369).

Tabla R69. Diversidad haplotípica ($\hat{H}$) y desviación estándar ($\pm$ d.e.) dentro de cada yacimiento, en el total de la población antigua, y en diferentes subconjuntos de la misma. Los valores fueron calculados para el fragmento total de 244pb (posiciones 16126-16369) y para los fragmentos parciales de 133pb (posiciones 16126-16258) y 112pb (16258-16369) por separado.

Población	Tamaño del fragmento					
	244pb		133pb		112pb	
	N	$\hat{H} \pm$ d.e.	N	$\hat{H} \pm$ d.e.	N	$\hat{H} \pm$ d.e.
Abauntz	3	1.0000 $\pm$ 0.2722	5	0.9000 $\pm$ 0.1610	5	0.7000 $\pm$ 0.2184
Atxuri	-	-	-	-	1	1.0000 $\pm$ 0.0000
Caldeirão	-	-	-	-	1	1.0000 $\pm$ 0.0000
Dja'de	1	1.0000 $\pm$ 0.0000	1	1.0000 $\pm$ 0.0000	3	0.6667 $\pm$ 0.3143
El Pirulejo	2	1.0000 $\pm$ 0.5000	2	1.0000 $\pm$ 0.5000	2	0.0000 $\pm$ 0.0000
Garaí	-	-	-	-	1	1.0000 $\pm$ 0.0000
Mari	6	1.0000 $\pm$ 0.0962	8	0.8571 $\pm$ 0.1083	8	0.7857 $\pm$ 0.1127
Nerja	4	1.0000 $\pm$ 0.1768	4	0.8333 $\pm$ 0.2224	4	0.6667 $\pm$ 0.2041
Tell Halula	7	0.9524 $\pm$ 0.0955	12	0.6212 $\pm$ 0.1176	16	0.8500 $\pm$ 0.0598
Tell Ramad	6	0.9333 $\pm$ 0.1217	7	0.2857 $\pm$ 0.1964	7	0.9048 $\pm$ 0.1033
Toledo	1	1.0000 $\pm$ 0.0000	1	1.0000 $\pm$ 0.0000	1	1.0000 $\pm$ 0.0000
Tres Montes	5	0.7000 $\pm$ 0.2184	6	0.8000 $\pm$ 0.1721	5	0.7000 $\pm$ 0.2184
Neolítico	30	0.9793 $\pm$ 0.0144	41	0.8024 $\pm$ 0.0440	48	0.8608 $\pm$ 0.0341
Paleolítico	5	1.0000 $\pm$ 0.1768	5	1.0000 $\pm$ 0.1768	5	0.6667 $\pm$ 0.2041
Neolítico PI	10	0.9111 $\pm$ 0.0773	13	0.8205 $\pm$ 0.0817	14	0.8462 $\pm$ 0.0614
Neolítico PO	14	0.9780 $\pm$ 0.0345	20	0.6947 $\pm$ 0.0700	26	0.8677 $\pm$ 0.0457
Población antigua	35	0.9765 $\pm$ 0.0126	48	0.8076 $\pm$ 0.0422	54	0.8337 $\pm$ 0.0375

Si se incluyen en el análisis las poblaciones actuales (**Tabla R70**) se mantiene en general la tendencia observada para el porcentaje de haplotipos diferentes, en la que las poblaciones de Próximo Oriente (Siria, Jordania y Turquía) se sitúan a la cabeza de la diversidad, aunque en este caso están superadas por la población de África del Este. Otras dos poblaciones africanas, Valle del Nilo y África del Oeste, a las que el porcentaje de haplotipos diferentes otorgaba una baja diversidad, se posicionan ahora inmediatamente a continuación de las poblaciones de Próximo Oriente.

La alta diversidad haplotípica de las poblaciones “Neolítico” y “Neolítico de Próximo Oriente”, se ve, sin embargo superada por las poblaciones actuales europeas de Francia, Bélgica y Estonia, que mostraban también un elevado número de haplotipos diferentes.

La de la muestra “Neolítico de la Península Ibérica” no dista de la de otras poblaciones actuales de la misma región geográfica como Galicia, Portugal, Cataluña, o País Vasco, mientras que la población andaluza es la que destaca por ser la de mayor variación intragrupal.

El grupo Saami, por su parte, se mantiene entre los menos diversos junto con la actual población de Suecia. Galicia y África del Sur presentan también escasa diversidad.

Tabla R70. Diversidad haplotípica ($\hat{H}$) y desviación estándar (d.e.) en 38 poblaciones actuales y en diferentes subconjuntos de población antigua en fragmentos de 244pb, 133pb y 112pb. Los valores se han listado según la diversidad haplotípica del fragmento de 244pb. Se señalan en negrita las poblaciones antiguas estudiadas.

Población	Tamaño del fragmento					
	244pb		133pb		112pb	
	N	$\hat{H} \pm \text{d.e.}$	N	$\hat{H} \pm \text{d.e.}$	N	$\hat{H} \pm \text{d.e.}$
Paleolítico	5	1.0000 $\pm$ 0.1768	5	1.0000 $\pm$ 0.1768	5	0.6667 $\pm$ 0.2041
África E	84	0.9951 $\pm$ 0.0027	84	0.9676 $\pm$ 0.0112	84	0.9802 $\pm$ 0.0050
Siria	49	0.9949 $\pm$ 0.0056	49	0.9124 $\pm$ 0.0337	49	0.9430 $\pm$ 0.0218
Jordania	42	0.9942 $\pm$ 0.0065	42	0.9791 $\pm$ 0.0108	42	0.9489 $\pm$ 0.0183
Turquía	70	0.9942 $\pm$ 0.0040	70	0.9321 $\pm$ 0.0208	70	0.9437 $\pm$ 0.0158
Valle del Nilo	237	0.9935 $\pm$ 0.0017	237	0.9748 $\pm$ 0.0041	237	0.9581 $\pm$ 0.0061
África O	427	0.9900 $\pm$ 0.0014	427	0.9409 $\pm$ 0.0076	427	0.9583 $\pm$ 0.0041
Francia	50	0.9869 $\pm$ 0.0086	50	0.8318 $\pm$ 0.0508	50	0.9388 $\pm$ 0.0238
Bélgica	25	0.9867 $\pm$ 0.0148	25	0.8433 $\pm$ 0.0709	25	0.9067 $\pm$ 0.0446
Estonia	26	0.9846 $\pm$ 0.0160	26	0.8738 $\pm$ 0.0464	26	0.8800 $\pm$ 0.0577
Neolítico	30	0.9793 $\pm$ 0.0144	41	0.8024 $\pm$ 0.0440	48	0.8608 $\pm$ 0.0341
Neolítico PO	14	0.9780 $\pm$ 0.0345	20	0.6947 $\pm$ 0.0700	26	0.8677 $\pm$ 0.0457
Suiza	17	0.9779 $\pm$ 0.0267	17	0.8088 $\pm$ 0.0789	17	0.8603 $\pm$ 0.0684
Bulgaria	30	0.9770 $\pm$ 0.0145	30	0.8506 $\pm$ 0.0560	30	0.9172 $\pm$ 0.0304
Canarias	54	0.9734 $\pm$ 0.0135	54	0.9106 $\pm$ 0.0308	54	0.8973 $\pm$ 0.0300
Grecia	45	0.9727 $\pm$ 0.0154	45	0.8798 $\pm$ 0.0423	45	0.8687 $\pm$ 0.0465
Andalucía	15	0.9714 $\pm$ 0.0327	15	0.9524 $\pm$ 0.0403	15	0.9333 $\pm$ 0.0449
Gran Bretaña	92	0.9709 $\pm$ 0.0108	92	0.8311 $\pm$ 0.0364	92	0.8552 $\pm$ 0.0349
Rusia N Cáucaso	178	0.9695 $\pm$ 0.0081	178	0.8838 $\pm$ 0.0201	178	0.8698 $\pm$ 0.0244
Albania	42	0.9686 $\pm$ 0.0174	42	0.8502 $\pm$ 0.0524	42	0.8177 $\pm$ 0.0535
Toscana	49	0.9660 $\pm$ 0.0189	49	0.9209 $\pm$ 0.0305	49	0.8707 $\pm$ 0.0434
Rusia Karelian	83	0.9630 $\pm$ 0.0113	83	0.8566 $\pm$ 0.0348	83	0.8598 $\pm$ 0.0287
Georgia	54	0.9623 $\pm$ 0.0180	54	0.8777 $\pm$ 0.0385	54	0.8798 $\pm$ 0.0388
Italia Sur	37	0.9580 $\pm$ 0.0271	37	0.8333 $\pm$ 0.0522	37	0.9144 $\pm$ 0.0413
Finlandia	146	0.9575 $\pm$ 0.0110	146	0.8577 $\pm$ 0.0260	146	0.8558 $\pm$ 0.0248
Sicilia	62	0.9540 $\pm$ 0.0202	62	0.8556 $\pm$ 0.0423	62	0.8059 $\pm$ 0.0515
Kurdistán	27	0.9516 $\pm$ 0.0320	27	0.8803 $\pm$ 0.0539	27	0.8405 $\pm$ 0.0594
Noruega	216	0.9471 $\pm$ 0.0121	216	0.8037 $\pm$ 0.0268	216	0.8539 $\pm$ 0.0226
Austria	100	0.9448 $\pm$ 0.0184	100	0.8655 $\pm$ 0.0309	100	0.8477 $\pm$ 0.0347
Druze Israel	45	0.9394 $\pm$ 0.0190	45	0.9040 $\pm$ 0.0221	45	0.8737 $\pm$ 0.0294
País Vasco	45	0.9343 $\pm$ 0.0243	45	0.6808 $\pm$ 0.0751	45	0.8384 $\pm$ 0.0476
Portugal	54	0.9322 $\pm$ 0.0289	54	0.8365 $\pm$ 0.0468	54	0.7526 $\pm$ 0.0590
Alemania	48	0.9255 $\pm$ 0.0322	48	0.7810 $\pm$ 0.0603	48	0.8431 $\pm$ 0.0525
Dinamarca	32	0.9254 $\pm$ 0.0334	32	0.8085 $\pm$ 0.0590	32	0.7742 $\pm$ 0.0744
Cataluña	15	0.9238 $\pm$ 0.0530	15	0.8286 $\pm$ 0.0823	15	0.9048 $\pm$ 0.0502
Cerdeña	67	0.9163 $\pm$ 0.0292	67	0.8191 $\pm$ 0.0470	67	0.7956 $\pm$ 0.0473
Neolítico PI	10	0.9111 $\pm$ 0.0773	13	0.8205 $\pm$ 0.0817	14	0.8462 $\pm$ 0.0614
África C	29	0.9089 $\pm$ 0.0256	29	0.9015 $\pm$ 0.0250	29	0.8399 $\pm$ 0.0465
Galicia	90	0.8777 $\pm$ 0.0328	90	0.7605 $\pm$ 0.0469	90	0.6350 $\pm$ 0.0591
África S	19	0.8538 $\pm$ 0.0537	19	0.8363 $\pm$ 0.0517	19	0.5088 $\pm$ 0.1171
Saami	90	0.8195 $\pm$ 0.0280	90	0.7815 $\pm$ 0.0271	90	0.7491 $\pm$ 0.0293
Suecia	25	0.8000 $\pm$ 0.0768	25	0.6667 $\pm$ 0.0936	25	0.7333 $\pm$ 0.0763
Europa	1787	0.9598 $\pm$ 0.0033	1787	0.8440 $\pm$ 0.0083	1787	0.8629 $\pm$ 0.0074
Próximo Oriente	233	0.9894 $\pm$ 0.0027	233	0.9354 $\pm$ 0.0114	233	0.9310 $\pm$ 0.0099
África	796	0.9953 $\pm$ 0.0005	796	0.9658 $\pm$ 0.0035	796	0.9691 $\pm$ 0.0025
Población actual	2816	0.9798 $\pm$ 0.0016	2816	0.9098 $\pm$ 0.0044	2816	0.9148 $\pm$ 0.0042
Población antigua	35	0.9765 $\pm$ 0.0126	48	0.8076 $\pm$ 0.0422	54	0.8337 $\pm$ 0.0375

6.1.4. Número medio de diferencias por parejas y diversidad nucleotídica

En las **Tablas R71 y R72** se muestra el número medio de diferencias por parejas y la diversidad nucleotídica (descripción en el apartado 16.3.4 del capítulo “Métodos”) relativos a los fragmentos de 244pb, 133pb y 112pb, analizados y comparados, por yacimientos (**Tabla R71**), y entre subconjuntos de población antigua y poblaciones actuales (**Tabla R72**).

Nerja y Mari exhiben el mayor número de diferencias por parejas y, por tanto, la mayor diversidad nucleotídica. Estos mismos yacimientos presentaban también una elevada diversidad a nivel de haplotipos ($\%k$ y $\hat{H}$). Sin embargo, los valores de π y π_n del yacimiento de Abautz, de diversidad haplotípica similar, son mucho menores. La explicación es la relación directa de este tipo de índices con el número de posiciones variables, que, como se ha visto en la **Tabla R65**, eran superiores en Nerja y Mari.

Cuando se calcula la diversidad nucleotídica y el número medio de diferencias por parejas en las poblaciones antiguas y actuales (**Tabla R72**) el orden que observábamos para los índices basados en haplotipos (**Tablas R68 y R70**) no se mantiene. En este caso, la mayor diversidad corresponde a todas las poblaciones africanas actuales exceptuando la de África del Sur.

Las poblaciones de Próximo Oriente (Jordania, Turquía y Siria), aunque menor que las africanas, exhiben también una elevada diversidad a nivel de nucleótido. Curiosamente en este caso se suma también la población “Drusos de Israel”, que contaba con un reducido número de haplotipos. Algunas poblaciones europeas, como la andaluza, tienen mayor diversidad que las poblaciones de Próximo Oriente. El ascendente africano de estas poblaciones, señalado por varios autores, podría explicar la gran diversidad nucleotídica mencionada (ARNAIZ-VILLENA *et al.* 1995; PINTO *et al.* 1996).

Las poblaciones “Neolítico” y “Neolítico de la Península Ibérica” presentan una diversidad nucleotídica elevada y similar a las poblaciones actuales de Próximo Oriente. Veíamos antes, sin embargo, que su diversidad haplotípica era muy baja (**Tabla R70**). Por el contrario, la población “Neolítico de Próximo Oriente” –de gran diversidad

haplotípica— muestra una baja diversidad nucleotídica, que contrasta con la elevada diversidad nucleotídica de las poblaciones actuales de Próximo Oriente.

Una vez más, entre las poblaciones menos diversas se encuentran Galicia y África del Sur. Sin embargo, los Saami, de baja diversidad haplotípica, son muy variables en cuanto a la diversidad nucleotídica.

Las diferencias entre los índices de diversidad basados en haplotipos y los que reflejan la variabilidad a nivel de nucleótido quedan patentes en la diferente ordenación de las poblaciones. El único conjunto de poblaciones actuales que exhibe una elevada diversidad tanto haplotípica como nucleotídica son las de Próximo Oriente. Desde la Genética de Poblaciones actuales se ha especulado que en esta zona podrían estar el origen de varias migraciones hacia Europa. La muestra neolítica de Próximo Oriente comparte, ciertamente, esa gran diversidad haplotípica, pero las diferencias en el número medio de diferencias por parejas (4.25 frente a 5.96 en población actual) y en la diversidad nucleotídica (0.017 vs 0.024) inducen a pensar que el tipo y frecuencia de los linajes mitocondriales que las caracterizan son diferentes. Para ahondar en esta cuestión es necesaria una disección más detallada de la composición genética de ambos conjuntos poblacionales, cuestión que se abordará más adelante.

Un razonamiento similar sirve para explicar los resultados de la población “Neolítico de la Península Ibérica”. Esta población se distingue por presentar una mayor diversidad nucleotídica que las poblaciones ibéricas actuales de Cataluña, País Vasco, Galicia y Portugal. Sin embargo su diversidad haplotípica se sitúa entre las más bajas del conjunto considerado. La escasa variedad haplotípica de las poblaciones peninsulares actuales citadas puede responder a fenómenos de expansión poblacional reciente a partir de escasos linajes fundadores. Las discrepancias observadas en la diversidad nucleotídica entre la población ibérica antigua y la actual pueden deberse a la existencia de diferencias en el tipo y frecuencia de sus linajes mitocondriales, tal y como sucede entre las poblaciones neolítica y actual de Próximo Oriente.

Tabla R72. Número medio de diferencias por parejas (π), diversidad nucleotídica (π_n), y las respectivas desviaciones estándar (d.e.) calculadas en 38 poblaciones actuales y en diferentes subconjuntos de población antigua en fragmentos de 244, 133 y 112pb. Las poblaciones se presentan ordenadas según el valor de ambos índices en el fragmento de 244 pb. Se señalan en **negrita** las poblaciones antiguas estudiadas.

Población	Tamaño del fragmento								
	244 pb			133 pb			112 pb		
	N	$\pi \pm \text{d.e.}$	$\pi_n \pm \text{d.e.}$	N	$\pi \pm \text{S.D.}$	$\pi_n \pm \text{S.D.}$	N	$\pi \pm \text{S.D.}$	$\pi_n \pm \text{S.D.}$
África C	29	10.4136 $\pm$ 4.892	0.0426 $\pm$ 0.0223	29	6.7671 $\pm$ 3.2835	0.0508 $\pm$ 0.0274	29	4.2501 $\pm$ 2.1699	0.0379 $\pm$ 0.0215
	84	10.2688 $\pm$ 4.7340	0.0420 $\pm$ 0.0214	84	6.1373 $\pm$ 2.9481	0.0461 $\pm$ 0.0245	84	4.4889 $\pm$ 2.2327	0.0400 $\pm$ 0.0220
	237	9.6727 $\pm$ 4.4481	0.0396 $\pm$ 0.0201	237	6.0055 $\pm$ 2.8727	0.0451 $\pm$ 0.0238	237	4.0164 $\pm$ 3.0140	0.0358 $\pm$ 0.0198
Valle del Nilo									
Jordania	42	7.5654 $\pm$ 3.6023	0.0310 $\pm$ 0.0163	42	4.9867 $\pm$ 2.4738	0.0374 $\pm$ 0.0206	42	2.8672 $\pm$ 1.5390	0.0256 $\pm$ 0.0152
África O	427	7.4443 $\pm$ 3.4861	0.0305 $\pm$ 0.0158	427	3.7440 $\pm$ 1.8930	0.0281 $\pm$ 0.0157	427	3.8777 $\pm$ 1.9509	0.0346 $\pm$ 0.0192
Andalucía	15	6.4197 $\pm$ 3.2210	0.0263 $\pm$ 0.0148	15	3.8702 $\pm$ 2.0583	0.0291 $\pm$ 0.0173	15	2.6885 $\pm$ 1.5143	0.0240 $\pm$ 0.0151
Turquía	70	5.9854 $\pm$ 2.8881	0.0245 $\pm$ 0.0131	70	3.5202 $\pm$ 1.8138	0.0264 $\pm$ 0.0151	70	2.6765 $\pm$ 1.4425	0.0238 $\pm$ 0.0142
Canarias	54	5.7746 $\pm$ 2.8066	0.0236 $\pm$ 0.0127	54	3.5561 $\pm$ 1.8360	0.0267 $\pm$ 0.0153	54	2.3676 $\pm$ 1.3102	0.0211 $\pm$ 0.0129
Siria	49	5.7014 $\pm$ 2.7791	0.0233 $\pm$ 0.0126	49	2.9176 $\pm$ 1.5569	0.0219 $\pm$ 0.0129	49	2.9382 $\pm$ 1.5661	0.0262 $\pm$ 0.0155
Georgia	54	5.3537 $\pm$ 2.6230	0.0219 $\pm$ 0.0119	54	2.4811 $\pm$ 1.3608	0.0186 $\pm$ 0.0113	54	3.0099 $\pm$ 1.5953	0.0268 $\pm$ 0.0158
Druze Israel	45	5.1802 $\pm$ 2.5553	0.0212 $\pm$ 0.0116	45	3.3832 $\pm$ 1.7654	0.0254 $\pm$ 0.0147	45	1.8956 $\pm$ 1.1019	0.0169 $\pm$ 0.0109
Neolítico PI	10	5.1570 $\pm$ 2.7284	0.0211 $\pm$ 0.0126	13	1.4231 $\pm$ 0.9276	0.0107 $\pm$ 0.0078	14	4.0435 $\pm$ 2.1468	0.0361 $\pm$ 0.0215
Italia Sur	37	5.1073 $\pm$ 2.5337	0.0209 $\pm$ 0.0115	37	2.3157 $\pm$ 1.2963	0.0174 $\pm$ 0.0108	37	2.9192 $\pm$ 1.5664	0.0260 $\pm$ 0.0155
Neolítico	30	5.0881 $\pm$ 2.5390	0.0208 $\pm$ 0.0115	41	1.4275 $\pm$ 0.8894	0.0107 $\pm$ 0.0074	48	3.1464 $\pm$ 1.6588	0.0280 $\pm$ 0.0164
Toscana	49	5.0764 $\pm$ 2.5059	0.0208 $\pm$ 0.0113	49	2.6458 $\pm$ 1.4363	0.0198 $\pm$ 0.0119	49	2.5474 $\pm$ 1.3925	0.0227 $\pm$ 0.0137
Saami	90	4.7661 $\pm$ 2.3517	0.0195 $\pm$ 0.0106	90	2.9470 $\pm$ 1.5578	0.0221 $\pm$ 0.0129	90	1.8990 $\pm$ 1.0932	0.0169 $\pm$ 0.0108
Rusia N Cáucaso	178	4.7048 $\pm$ 2.3145	0.0192 $\pm$ 0.0104	178	2.4029 $\pm$ 1.3118	2.4029 $\pm$ 1.3118	178	2.4511 $\pm$ 1.3331	0.0218 $\pm$ 0.0131
Estonia	26	4.6924 $\pm$ 2.3743	0.0192 $\pm$ 0.0108	26	2.1572 $\pm$ 1.2367	0.0162 $\pm$ 0.0103	26	2.6463 $\pm$ 1.4587	0.0236 $\pm$ 0.0145
Francia	50	4.5812 $\pm$ 2.2884	0.0187 $\pm$ 0.0104	50	2.3873 $\pm$ 1.3206	0.0179 $\pm$ 0.0110	50	2.3089 $\pm$ 1.2856	0.0206 $\pm$ 0.0127
Bulgaria	30	4.5693 $\pm$ 2.3093	0.0187 $\pm$ 0.0105	30	2.3343 $\pm$ 1.3116	0.0175 $\pm$ 0.0109	30	2.3561 $\pm$ 1.3214	0.0210 $\pm$ 0.0131
Albania	42	4.4547 $\pm$ 2.2402	0.0182 $\pm$ 0.0101	42	3.0752 $\pm$ 1.6314	0.0231 $\pm$ 0.0136	42	1.5733 $\pm$ 0.9562	0.0140 $\pm$ 0.0094
Kurdistán	27	4.3546 $\pm$ 2.2212	0.0178 $\pm$ 0.0101	27	2.6077 $\pm$ 1.4394	0.0196 $\pm$ 0.0120	27	1.8343 $\pm$ 1.0875	0.0163 $\pm$ 0.0108
Grecia	45	4.3270 $\pm$ 2.1811	0.0177 $\pm$ 0.0099	45	2.2191 $\pm$ 1.2477	0.0166 $\pm$ 0.0104	45	2.2307 $\pm$ 1.2529	0.0199 $\pm$ 0.0124
Neolítico PO	14	4.2555 $\pm$ 2.2442	0.0174 $\pm$ 0.0103	20	0.9732 $\pm$ 0.6894	0.0073 $\pm$ 0.0057	26	2.7465 $\pm$ 1.5039	0.0245 $\pm$ 0.0149
Bélgica	25	4.1961 $\pm$ 2.1562	0.0171 $\pm$ 0.0098	25	2.2652 $\pm$ 1.2876	0.0170 $\pm$ 0.0107	25	2.0295 $\pm$ 1.1799	0.0181 $\pm$ 0.0117
Gran Bretaña	92	4.1136 $\pm$ 2.0675	0.0168 $\pm$ 0.0093	92	2.2473 $\pm$ 1.2485	0.0168 $\pm$ 0.0103	92	1.9750 $\pm$ 1.1271	0.0176 $\pm$ 0.0111

Tabla R72. (Continuación)

Población	Tamaño del fragmento					
	244 pb		133 pb		112 pb	
	N	$\pi \pm d.e.$	$\pi_n \pm d.e.$	N	$\pi \pm d.e.$	$\pi_n \pm d.e.$
Rusia Karelian	83	4.0722 ± 2.0514	0.0166 ± 0.0093	83	2.3272 ± 1.2852	0.0174 ± 0.0107
Finlandia	146	3.9779 ± 2.0017	0.0163 ± 0.0090	146	2.0881 ± 1.1737	0.0157 ± 0.0097
Cerdeña	67	3.9721 ± 2.0127	0.0162 ± 0.0091	67	2.3270 ± 1.2882	0.0174 ± 0.0107
Noruega	216	3.9471 ± 1.9847	0.0161 ± 0.0090	216	1.9497 ± 1.1100	0.0146 ± 0.0092
Paleolítico	5	3.9195 ± 2.4730	0.0160 ± 0.0121	5	3.3060 ± 2.1337	0.0248 ± 0.0191
Sicilia	62	3.8767 ± 1.9729	0.0158 ± 0.0089	62	2.1762 ± 1.2222	0.0163 ± 0.0101
Alemania	48	3.8235 ± 1.9573	0.0156 ± 0.0089	48	1.7867 ± 1.0512	0.0134 ± 0.0087
Austria	100	3.8235 ± 1.9573	0.0190 ± 0.0104	100	2.6022 ± 1.4046	0.0195 ± 0.0116
Cataluña	15	3.7153 ± 1.9872	0.0152 ± 0.0091	15	1.7657 ± 1.0829	0.0132 ± 0.0091
Suecia	25	3.6265 ± 1.9015	0.0148 ± 0.0086	25	2.1016 ± 1.2129	0.0158 ± 0.0101
Portugal	54	3.6222 ± 1.8651	0.0148 ± 0.0084	54	2.1812 ± 1.2269	0.0164 ± 0.0102
Dinamarca	32	3.5372 ± 1.8476	0.0144 ± 0.0084	32	1.8103 ± 1.0712	0.0136 ± 0.0089
Suiza	17	3.4161 ± 1.8371	0.0140 ± 0.0084	17	1.7437 ± 1.0653	0.0131 ± 0.0089
País Vasco	45	3.2331 ± 1.6991	0.0132 ± 0.0077	45	1.3965 ± 0.8734	0.0105 ± 0.0072
África S	19	3.0649 ± 1.6675	0.0125 ± 0.0076	19	2.1576 ± 1.2520	0.0162 ± 0.0105
Galicia	90	2.7606 ± 1.4758	0.0113 ± 0.0067	90	1.6698 ± 0.9900	0.0125 ± 0.0082
Europa	1787	4.3723 ± 2.1616	0.0179 ± 0.0097	1787	2.3621 ± 1.2885	0.0177 ± 0.0107
Próximo Oriente	233	5.9656 ± 2.8557	0.0244 ± 0.0129	233	3.6104 ± 1.8380	0.0271 ± 0.0152
África	796	9.0491 ± 4.1704	0.0370 ± 0.0189	796	5.2029 ± 2.5207	0.0391 ± 0.0209
Población actual	2816	6.1827 ± 2.9396	0.0253 ± 0.0133	2816	3.5040 ± 1.7860	0.0263 ± 0.0148
Población antigua	35	4.8453 ± 2.4216	0.0198 ± 0.0110	48	1.4954 ± 0.9180	0.0112 ± 0.0076
				54	2.8758 ± 1.5360	0.0256 ± 0.0152

6.2. Distribución de las diferencias por parejas

En los **Gráficos FR38–FR52** se muestran las distribuciones de las diferencias por parejas de secuencias (*Mean Pairwise Differences* o *Mismatch distributions*) de las regiones de 244pb, 133pb y 112pb en diferentes agrupaciones de las muestras de población antigua (ver apartado 16.2. de “Métodos”) y sus correspondientes distribuciones esperadas según el modelo de expansión súbita de Rogers y Harpending (1992). Las distribuciones se han calculado según lo descrito en el apartado 16.4 del capítulo “Métodos”.

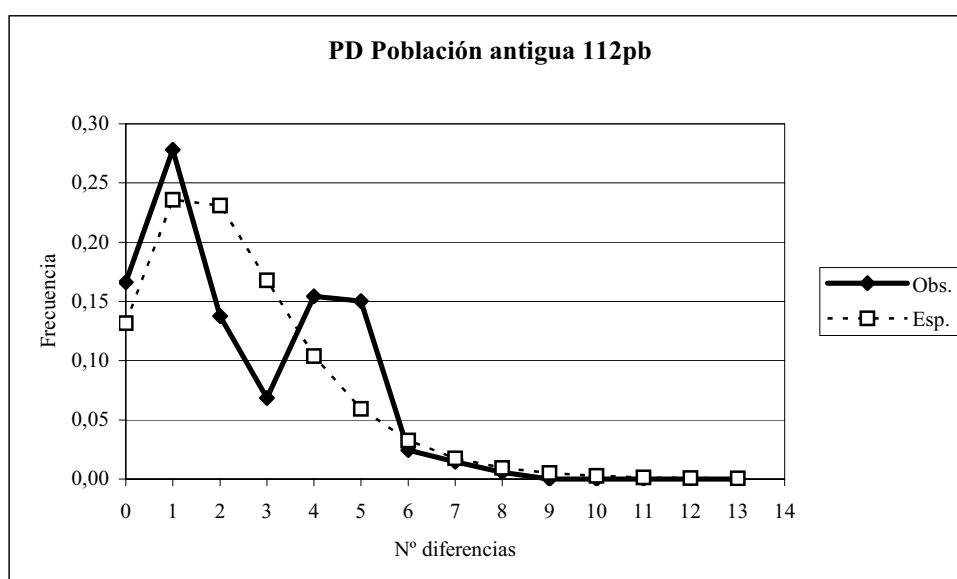
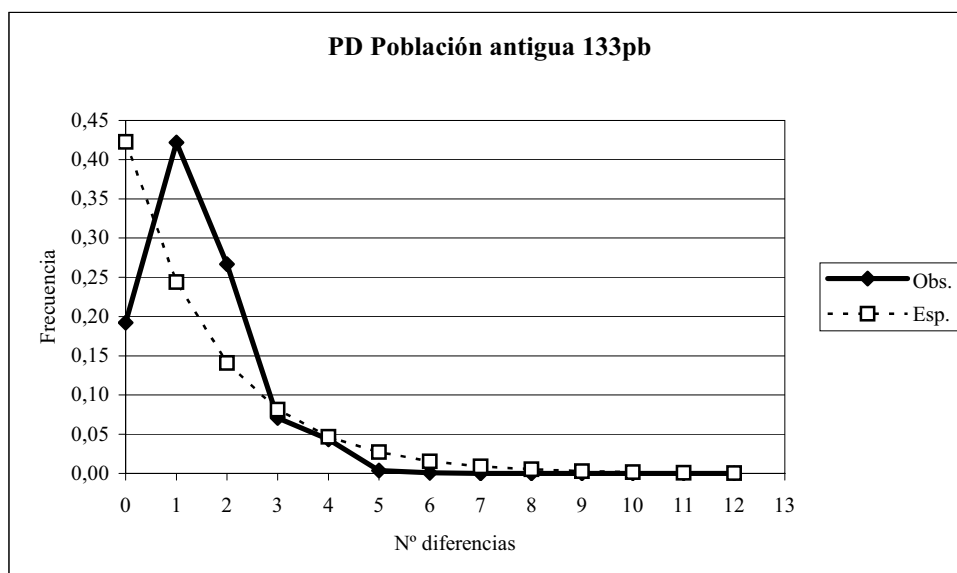
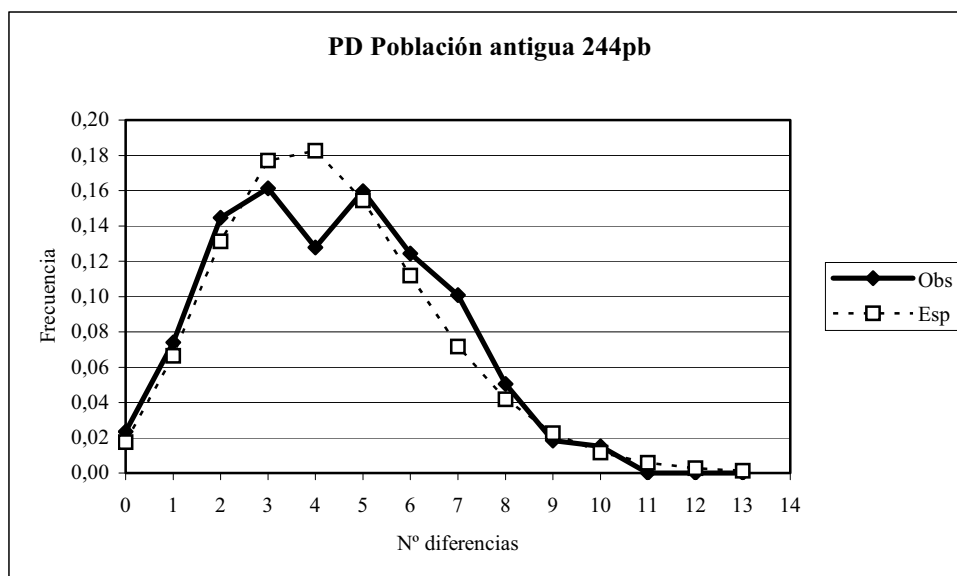
Para el segmento completo de 244pb la distribución de las diferencias por parejas de la muestra completa presenta dos máximos de frecuencia en 3 y 5 cambios. Este patrón bimodal se mantiene cuando se distingue entre población “Paleolítico” y “Neolítico”. Aparece también en la población “Neolítico de Próximo Oriente”. Por el contrario, la población “Neolítico de la Península Ibérica” muestra un patrón de distribución de las diferencias por parejas bastante irregular.

Cuando se comparan las diferentes distribuciones obtenidas con la distribución esperada, según el modelo de expansión súbita de Rogers y Harpending (1992) no se produce un ajuste significativo a este modelo en ninguna de las poblaciones para ninguno de los fragmentos analizados.

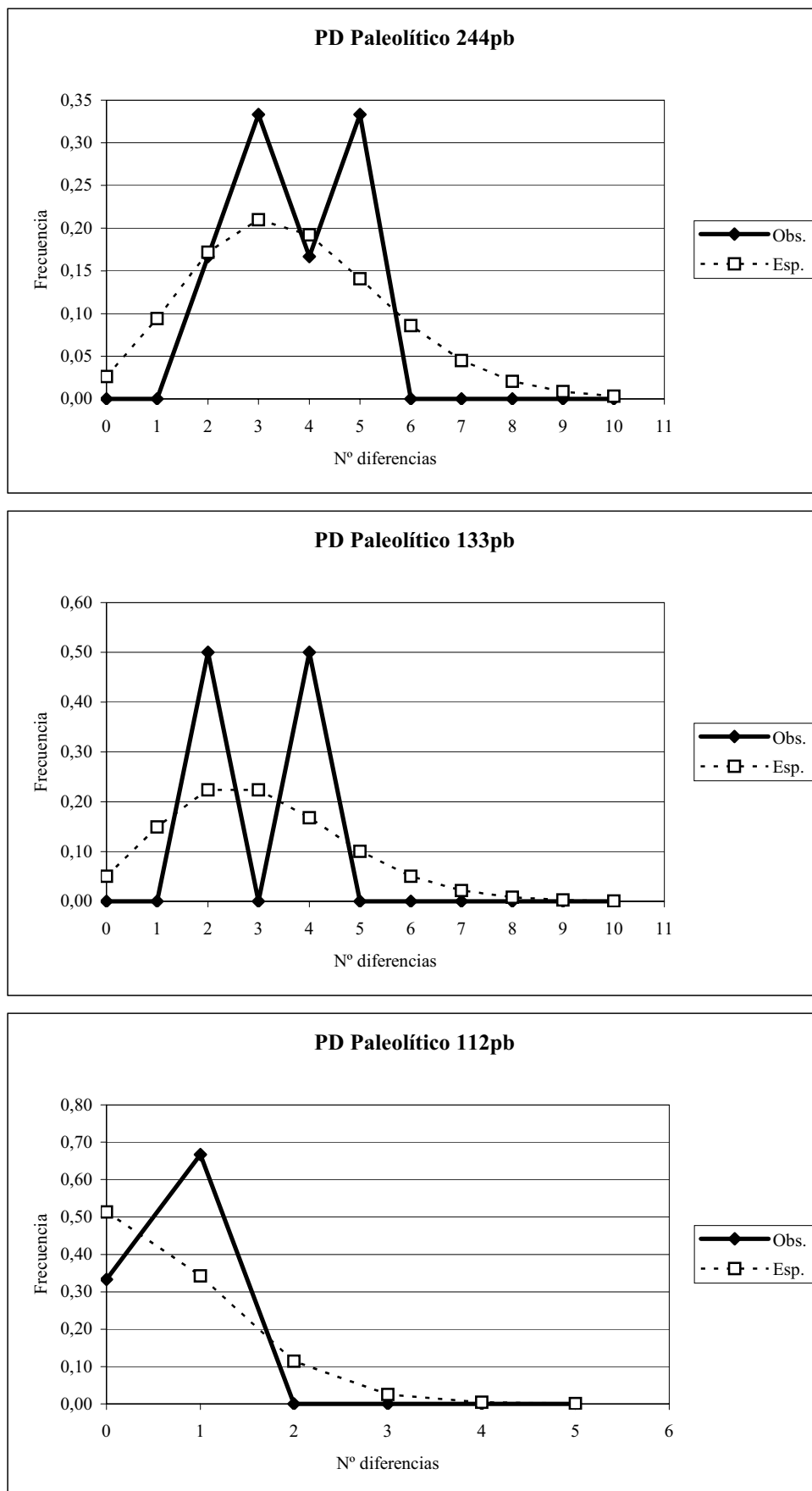
Tabla R73. Valores de χ^2 , grados de libertad (g.d.l.) y probabilidad (P) obtenidos para el “Test de la bondad de ajuste” en el conjunto de muestras antiguas (Total), y las poblaciones “Neolítico”, “Paleolítico”, “Neolítico de Próximo Oriente” y “Neolítico de la Península Ibérica”. La composición de estas poblaciones se describe en el apartado 16.2. del capítulo “Métodos”.

Población	Tamaño del fragmento								
	244pb			133pb			112pb		
	χ^2	g.d.l.	P	χ^2	g.d.l.	P	χ^2	g.d.l.	P
Total	29.07	11	0.9936	478.88	10	1	417.51	11	1
Neolítico	35.92	11	1	54.28	4	1	328.92	11	1
Paleolítico	3.27	4	0.2267	9.14	3	0.89	2.91	1	0.7666
Neolítico Próximo Oriente	6.53	7	0.3143	25.60	2	1	36.81	7	1
Neolítico Península Ibérica	31.456	8	1	8.72	3	0.8794	79.43	8	1

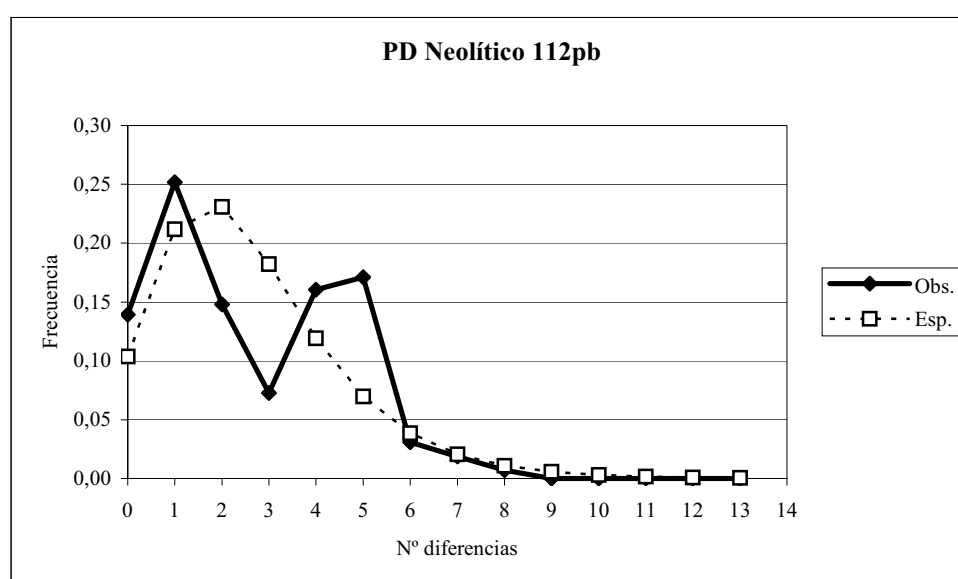
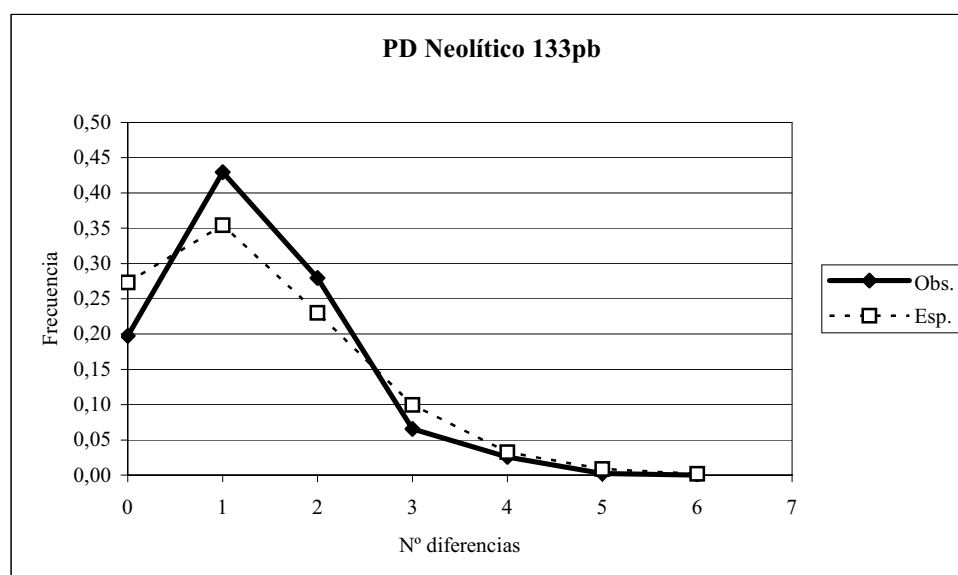
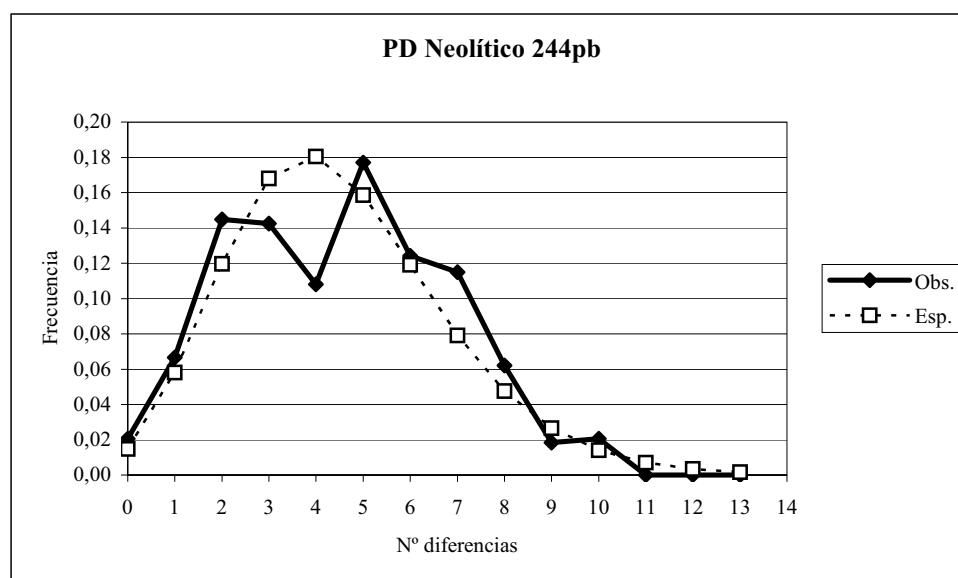
Las curvas de las distribuciones de las diferencias por parejas de las diferentes poblaciones antiguas (Gráficos **FR38–FR52**) se desplazan hacia la izquierda a medida que disminuye el tamaño del fragmento, probablemente como resultado de la pérdida de diversidad genética que comporta el análisis de un fragmento más pequeño. En la distribución de las diferencias por parejas del fragmento de 133pb (posiciones 16126→16258) se mantiene la forma acampanada en todas las poblaciones excepto en la población “Paleolítico”, cuya representación muestral, como se ha apuntado anteriormente, es demasiado reducida para extraer conclusiones sólidas. Con todo, la distribución del fragmento de 112pb (posiciones 16258→16369) muestra, en todas las poblaciones antiguas, un aspecto tendente a bimodal, incluso en los casos en que la distribución del fragmento completo se ajusta a la curva teórica del modelo de expansión. Los máximos de frecuencia se sitúan en todas las citadas distribuciones entre 1 y 4-5 diferencias.



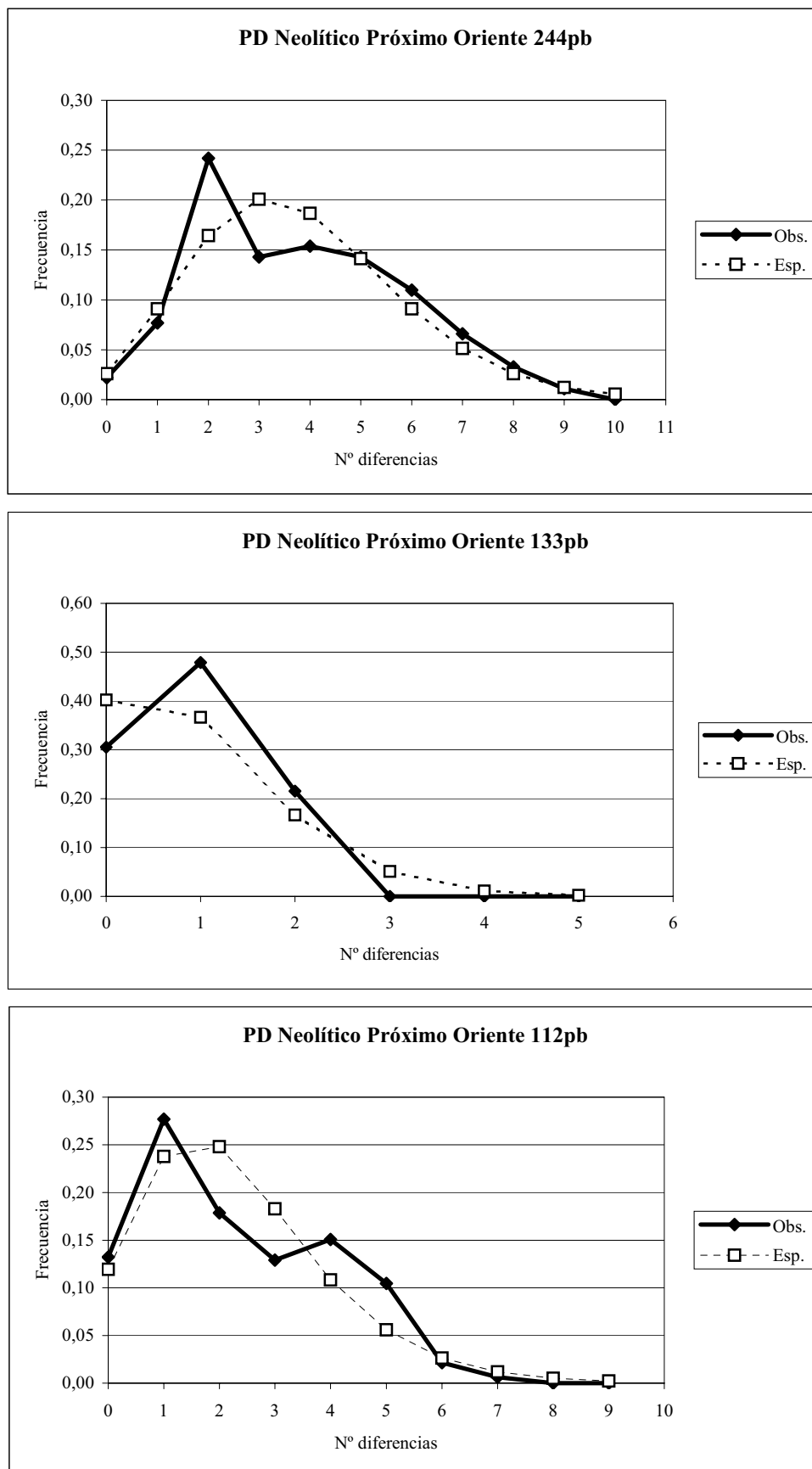
Gráficos FR38, FR39 y FR40. Distribuciones de las diferencias por parejas (*Pairwise differences*) observadas (Obs) y esperadas (Esp) según el modelo de expansión súbita de Rogers y Harpending (1992) para los segmentos de 244pb (FR38), 133pb (FR39) y 112pb (FR40) en la muestra antigua completa.



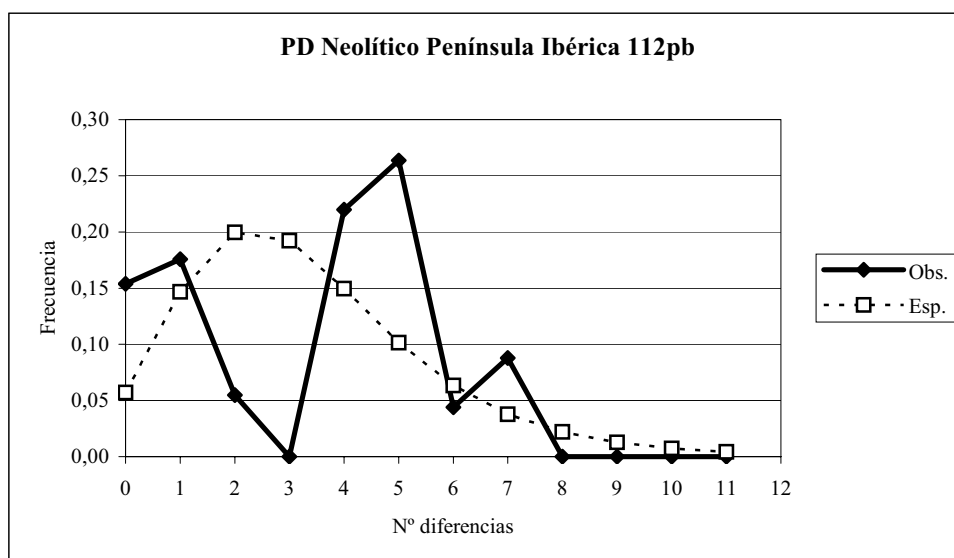
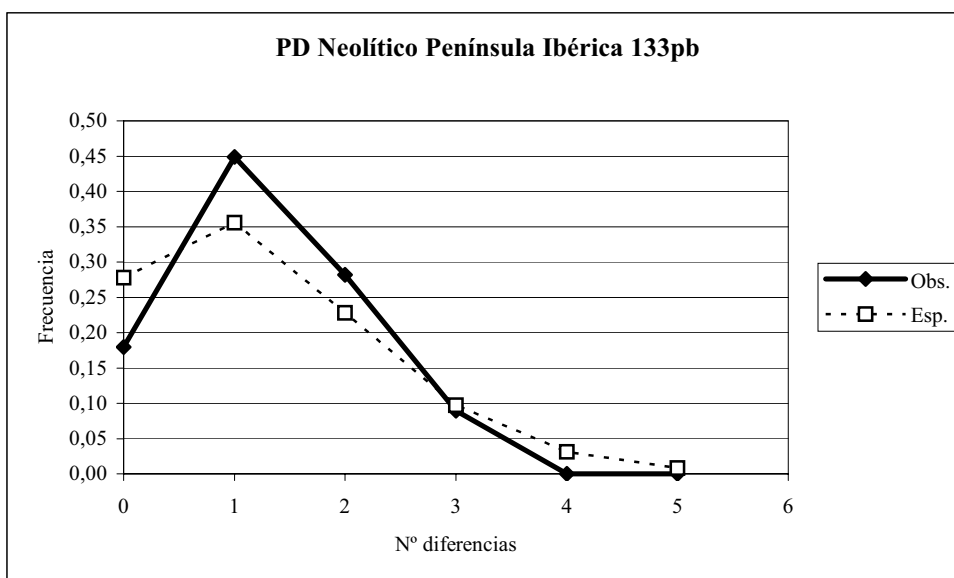
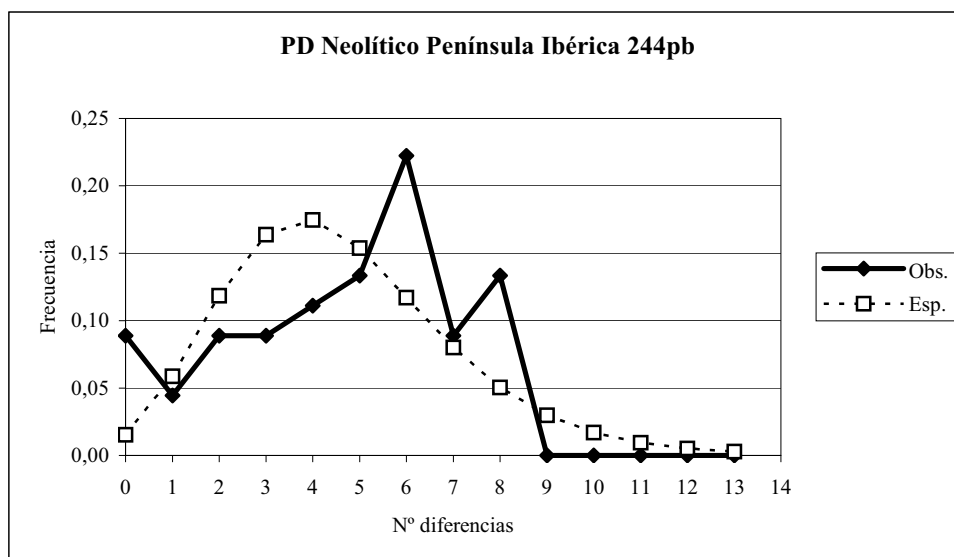
Gráficos FR41, FR42 y FR43. Distribuciones de las diferencias por parejas (*Pairwise differences*) observadas (Obs) y esperadas (Esp) según el modelo de expansión súbita de Rogers y Harpending (1992) para los segmentos de 244pb (FR41), 133pb (FR42) y 112pb (FR43) en la población “Paleolítico”.



Gráficos FR44, FR45 y FR46. Distribuciones de las diferencias por parejas (*Pairwise differences*) observadas (Obs) y esperadas (Esp) según el modelo de expansión súbita de Rogers y Harpending (1992) para los segmentos de 244pb (FR44), 133pb (FR45) y 112pb (FR46) en la población “Neolítico”.



Gráficos FR47, FR48 y FR49. Distribuciones de las diferencias por parejas (*Pairwise differences*) observadas (Obs) y esperadas (Esp) según el modelo de expansión súbita de Rogers y Harpending (1992) para los segmentos de 244pb (FR47), 133pb (FR48) y 112pb (FR49) en la población “Neolítico de Próximo Oriente”.



Gráficos FR50, FR51 y FR52. Distribuciones de las diferencias por parejas (*Pairwise differences*) observadas (Obs) y esperadas (Esp) según el modelo de expansión súbita de Rogers y Harpending (1992) para los segmentos de 244pb (FR50), 133pb (FR51) y 112pb (FR52) en la población “Neolítico de la Península Ibérica”.

Se ha calculado, también, el índice de irregularidad de Harpending (r) (apartado 16.4. del capítulo “Métodos”) para los segmentos de 244pb, 133pb y 112pb tanto en el conjunto de muestras antiguas estudiadas como en los diferentes subconjuntos de población creados a partir de la misma (**Tabla R74**). Este índice define la forma de la distribución y, a efectos prácticos, puede considerarse que valores inferiores a 0.03 corresponden a distribuciones acampanadas características de poblaciones que han sufrido un proceso de expansión súbita y reciente, mientras que valores por encima definen aquellas poblaciones en equilibrio demográfico (JOBLING *et al.* 2003).

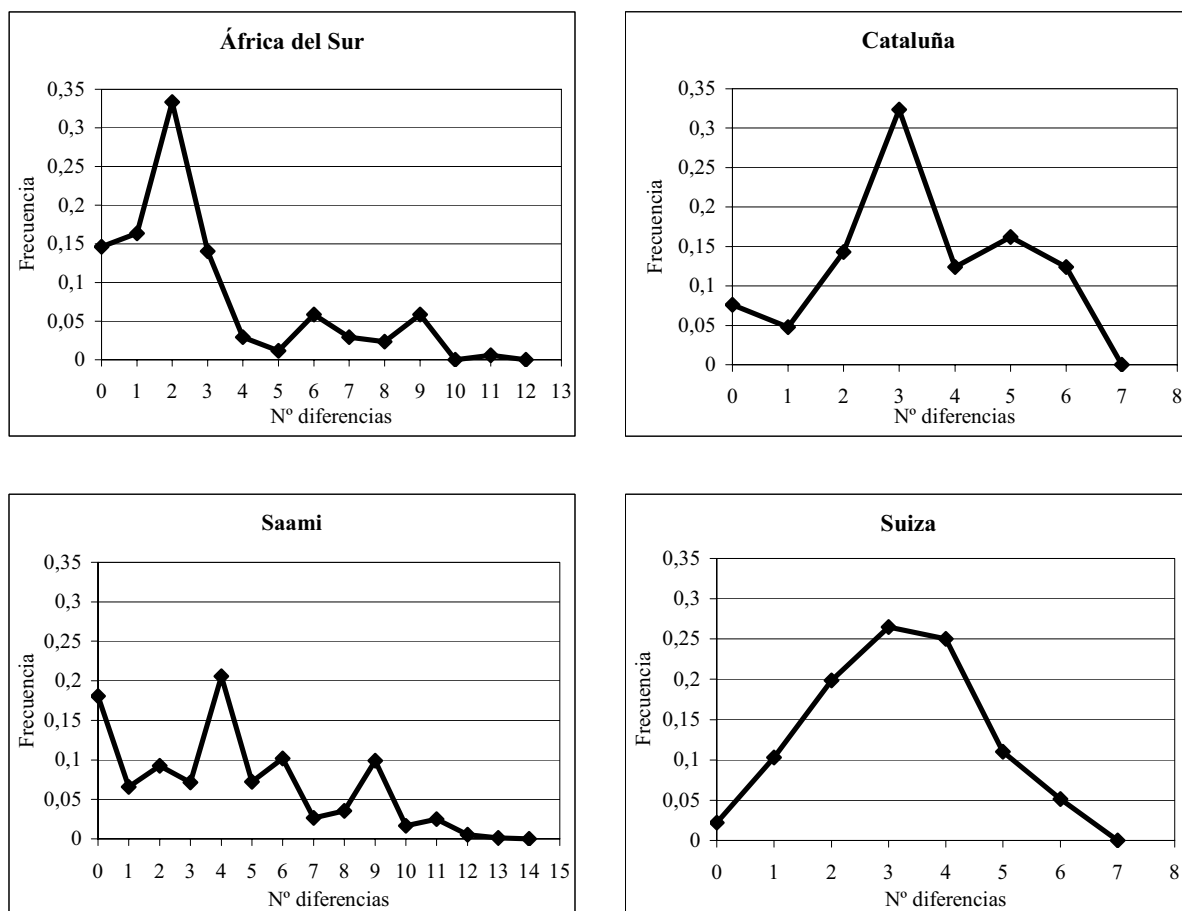
Tabla R74. Índices de irregularidad de Harpending (r) obtenidos en el conjunto de muestras antiguas (Total), y los subconjuntos de población “Neolítico”, “Paleolítico”, “Neolítico Próximo Oriente” y “Neolítico Península Ibérica” (ver apartado 16.2. del capítulo “Métodos”).

Población	Tamaño del segmento					
	244 pb		133 pb		112 pb	
	N	r	N	r	N	r
Total	35	0.0156	48	0.1175	54	0.0605
Neolítico	30	0.0222	41	0.1239	48	0.0569
Paleolítico	4	0.2222	4	1	4	0.5556
Neolítico Próximo Oriente	14	0.0449	20	0.146	26	0.0428
Neolítico Península Ibérica	10	0.0504	13	0.1453	14	0.1263

De acuerdo con el índice de irregularidad de Harpending, la distribución de las diferencias por parejas en el fragmento completo de 244pb de la población antigua “Total” y de la sub-población “Neolítico” se acomodaría al tipo gaussiano. Las población “Neolítico de la Península Ibérica”, cuya distribución de las diferencias por parejas de las secuencias de 244pb no se ajustaba significativamente al modelo de expansión súbita (**Tabla R73** y **Figura FR50**), exhibe también un elevado índice de irregularidad. Por su parte, la población “Neolítico de Próximo Oriente”, que tampoco se ajustaba a la distribución esperada según un modelo de expansión súbita, presenta aquí un índice de irregularidad por encima del valor teórico de 0.03.

El índice de irregularidad de Harpending se estimó, asimismo, en diferentes poblaciones europeas, africanas y de Próximo Oriente (**Tabla R75**). En el conjunto de estas poblaciones, el índice presenta valores comprendidos entre 0.0036 (Valle del Nilo) y 0.1009 (Cataluña). Aquellas poblaciones con índices de irregularidad superiores

a 0.3, señaladas en negrita en la tabla, presentan un patrón irregular evidente en la distribución de las diferencias por parejas (**Gráficos FR53, FR54, FR55 y FR56**), a excepción de la población de Suiza.



Gráficos FR53, FR54, FR55 y FR56. Distribuciones de las diferencias por parejas (*Pairwise differences*) en cuatro poblaciones actuales con índice de irregularidad de Harpending (r) superior a 0.03. **FR53:** África del Sur; **FR54:** Cataluña; **FR55:** Saami; **FR56:** Suiza.

Tabla R75. Índices de irregularidad de Harpending (r) obtenidos en 38 poblaciones actuales.

Población	N	r		
		244pb	133pb	112pb
Alemania	48	0.0151	0.0327	0.0358
Austria	100	0.0085	0.0211	0.0405
Bulgaria	30	0.0157	0.0295	0.0753
Canarias	54	0.0074	0.0190	0.0811
Cerdeña	67	0.0111	0.0201	0.0464
Francia	50	0.0173	0.0202	0.0942
Galicia	90	0.0211	0.0751	0.0378
Toscana	49	0.0127	0.0444	0.0348
Kurdistán	27	0.0235	0.0263	0.0662
Suecia	25	0.0260	0.1045	0.0746
País Vasco	45	0.0258	0.0546	0.0483
África Central	29	0.0243	0.0404	0.0388
África Sur	19	0.0868	0.0688	0.1337
África Este	84	0.0046	0.0103	0.0229
África Oeste	427	0.0062	0.0219	0.0233
Albania	42	0.0174	0.0234	0.0990
Andalucía	15	0.0268	0.0313	0.0703
Bélgica	25	0.0279	0.0713	0.0917
Cataluña	15	0.1009	0.0626	0.1058
Dinamarca	32	0.0195	0.0460	0.0727
Druze Israel	45	0.0258	0.0197	0.0976
Estonia	26	0.0161	0.0633	0.0342
Finlandia	146	0.0182	0.0456	0.0653
Georgia	54	0.0068	0.0325	0.0184
Gran Bretaña	92	0.0203	0.0398	0.0630
Grecia	45	0.0190	0.0772	0.0479
Sicilia	62	0.0153	0.0415	0.0552
Italia del Sur	37	0.0097	0.0361	0.0396
Noruega	216	0.0137	0.0364	0.0487
Jordania	42	0.0164	0.0199	0.0773
Portugal	54	0.0134	0.0398	0.0576
Rusia	83	0.0175	0.0367	0.1012
Karelian				
Rusia Norte	178	0.0110	0.0392	0.0318
Cáucaso				
Saami	90	0.0680	0.0409	0.0867
Siria	49	0.0146	0.0321	0.0428
Suiza	17	0.0459	0.0508	0.0966
Turquía	70	0.0112	0.0234	0.0989
Valle del Nilo	237	0.0036	0.0102	0.0233

El resultado sugiere que la aparente bimodalidad de la distribución de las diferencias por parejas de las secuencias de las poblaciones “Neolítico” y “Neolítico” de Próximo Oriente” no es significativa y por lo tanto su forma puede equipararse a la del modelo de expansión súbita. Esta interpretación debe, no obstante, acogerse con cautela, siendo importante recalcar lo artificioso del ensamblaje de las muestras antiguas en poblaciones. Estas poblaciones han sido creadas agrupando las muestras de las que pudo obtenerse información genética según criterios cronológicos y geográficos. Tenido esto en cuenta, resulta obvio que cuanto más genérica sea la clasificación, tanto más artificiosa será. Resulta evidente cuando se considera la muestra en su totalidad y se agrupa bajo el nombre de “población antigua”. Con todo, resulta sorprendente que la distribución de las diferencias por parejas de esta población, a pesar de presentar dos picos de frecuencia, recuerde bastante a la distribución acampanada propia de las poblaciones que han sufrido un proceso de expansión.

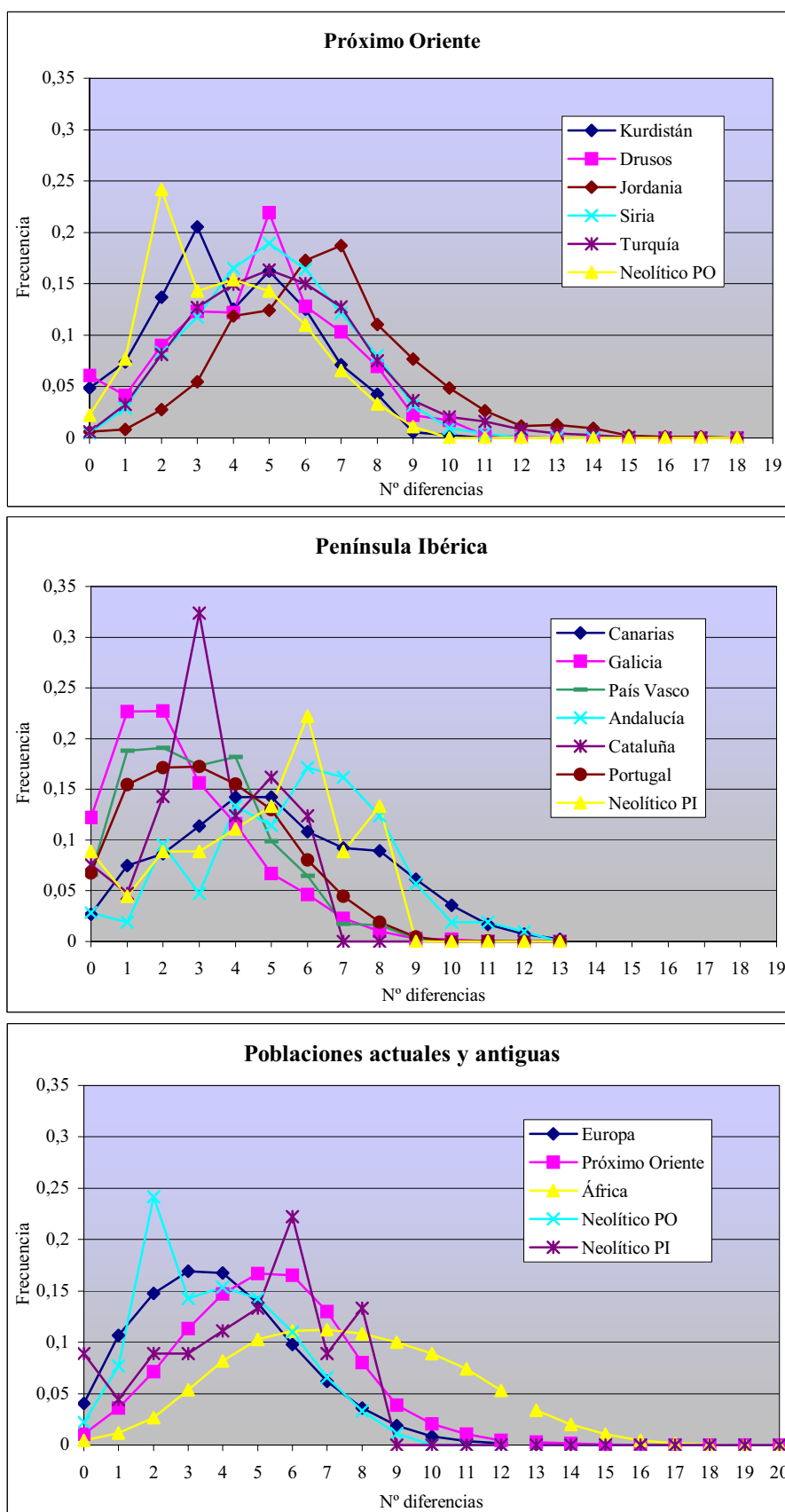
La población “Neolítico” engloba muestras de diferente cronología y procedencia geográfica, y su clasificación sólo cobra sentido bajo los supuestos de un origen común pre-Neolítico para todas ellas y de que no se han producido cambios sustanciales en su composición genética desde ese momento. La distribución de las diferencias por parejas de esta población presenta un patrón bastante irregular no compatible, en principio, con un fenómeno de expansión poblacional reciente. Ello podría indicar ausencia de homogeneidad en esta clasificación y cuestionaría los supuestos anteriores, aunque para considerar esta conclusión como definitiva es necesario reunir mayor número de evidencias.

Si centramos la atención en las muestras de Próximo Oriente, procedentes de tres yacimientos sirios diferentes –aunque cronológicamente contemporáneos (10000-9000 B.P.)–, y en las de la Península Ibérica –heterogéneas por su procedencia y cronología–, lo artificioso de la clasificación “Neolítico” se hace evidente. Por su proximidad geográfica y cronológica, los yacimientos de la muestra “Neolítico de Próximo Oriente” poseen suficiente entidad propia como para considerarlos una “población natural”.

Por su parte, la población “Neolítico de la Península Ibérica” reúne muestras de época neolítica de Málaga y de época calcolítica de Málaga y de Navarra, además de algún resto de la Edad del Bronce del País Vasco. Como sucedía con la población “Neolítico”, tal agrupación sólo tiene validez si suponemos un origen genético común de todos ellos. La distribución de las diferencias por parejas de este conjunto es bastante irregular y recuerda a la de las poblaciones que han atravesado un “cuello de botella”. Según Rogers y Harpending (1992) la signatura de este evento, en las diferencias por parejas, es la serie de picos de elevada frecuencia situados en la *cola derecha* de la distribución, es decir, correspondientes a un mayor número de diferencias. Si consideramos la población Calcolítica de la Península Ibérica –ya que la mayor parte de muestras del conjunto corresponden a este período– como una “población natural” la distribución de las diferencias por parejas debería interpretarse como evidencia de un cuello de botella reciente en su historia.

En los gráficos **FR57** y **FR58** se comparan las distribuciones de las diferencias por parejas para el segmento de 244pb de poblaciones antiguas y actuales de las regiones de Próximo Oriente y de la Península Ibérica respectivamente.

Las poblaciones Siria y Turquía presentan una distribución gaussiana típica con una media de 5 diferencias aproximadamente. El resto de poblaciones actuales presentan un patrón más irregular. Sin embargo, los índices de irregularidad de Harpending (**Tabla R75**) indican que todas ellas se ajustan al modelo de expansión súbita. La población de Kurdistan presenta un patrón de distribución de las diferencias por parejas muy similar al de la población “Neolítico de Próximo Oriente” con un máximo a tres diferencias.



Gráficos FR57, FR58 y FR59. Distribuciones de las diferencias por parejas (*Pairwise differences*) en el segmento de 244pb para poblaciones antiguas y actuales de Próximo Oriente (**Gráfico FR57**) y de la Península Ibérica (**FR58**). En el gráfico **FR59** se representa la misma distribución en las poblaciones antiguas “Neolítico de Próximo Oriente”, “Neolítico de la Península Ibérica” más el conjunto de poblaciones actuales europeas, africanas y de Próximo Oriente.

6.3. Análisis filogenético interpoblacional

6.3.1. Distancias genéticas

En la **Tabla R76** se muestran los valores de la distancia de Reynolds (REYNOLDS *et al.* 1983) –calculada según lo descrito en el apartado 16.5.1. del capítulo “Métodos”–, entre las 38 poblaciones actuales de referencia y las poblaciones antiguas “Neolítico” (NEOL), “Paleolítico” (PAL), “Neolítico de Próximo Oriente” (NEPO) y “Neolítico de la Península Ibérica” (NEPI) (apartado 16.2., capítulo “Métodos”).

La muestra más alejada es “Paleolítico”, seguida por las poblaciones de Suecia, África del Sur y Saami (**Gráficos FR60-FR64**). La población más cercana a la paleolítica es otra población antigua, la población “Neolítico”, mientras que las poblaciones más distantes de ésta son también las que más distan del conjunto restante: Suecia, Saami y África del Sur. La muestra paleolítica se aleja también de las dos poblaciones actuales procedentes de la misma región geográfica: Andalucía y Portugal. El aparente distanciamiento de la población “Paleolítico” del resto de poblaciones, se debe a que dos de sus cuatro haplotipos no se encuentran representados en ninguna de ellas, como se detalla en la sección 6.3.3.2., de este mismo capítulo. Ello puede responder a su bajo tamaño muestral. En este sentido, la caracterización genética de otras muestras paleolíticas permitirá determinar si las poblaciones de este período eran completamente diferentes a las poblaciones actuales o puede hablarse de una continuidad genética desde el Paleolítico hasta la actualidad, con pérdida de algunos linajes concretos.

La divergencia de la población de África del Sur de las restantes poblaciones puede explicarse de la misma manera, pues ninguno de los 10 haplotipos representados en ella figuran en el resto de poblaciones estudiadas.

Sin embargo, el porcentaje de haplotipos únicos es bajo en las poblaciones de Suecia y en los Saami. Su divergencia se debe a la combinación de dos factores: baja frecuencia de los motivos más frecuentes en el resto de poblaciones y elevada de ciertas variantes poco frecuentes. Así sucede, por ejemplo, con la secuencia consenso o *CRS*,

cuya frecuencia media en el conjunto de poblaciones ronda el 13%, pero que únicamente está presente en dos individuos de Suecia, y totalmente ausente en las poblaciones Saami y África del Sur. Las dos primeras comparten, a su vez, el haplotipo 16298C que define al haplogrupo V. Este haplotipo, de frecuencia global de 2.6%, caracteriza al 44% de los individuos de Suecia y al 33.3% de los Saami. La población Saami presenta, además, una elevada frecuencia de otros dos motivos raros en el resto de poblaciones: el haplotipo 16144C-16189C-16270T, característico del haplogrupo U5b1 (24.4%) y el haplotipo del mismo haplogrupo 16144C-16148T-16189C-16270T-16335G (10%).

La media de las distancias de todas las poblaciones respecto al conjunto de poblaciones antiguas (**Gráfico FR63**) es mucho mayor que la que se observa respecto al conjunto de poblaciones europeas (**Gráfico FR60**) y de Próximo Oriente (**Gráfico FR61**), y sensiblemente mayor que la del grupo africano (**Gráfico FR62**).

Según la distancia de Reynolds, la muestra “Neolítico” –formada por individuos del Neolítico y del Calcolítico–, está más próxima a las poblaciones africanas que a las de Europa y Próximo Oriente. De hecho, las distancias menores respecto a esta población corresponden a dos poblaciones actuales africanas: Valle del Nilo (0.0307) y África del Oeste (0.0311). Otras poblaciones próximas son: otra muestra del continente negro: África del Este (0.0344); dos de Próximo Oriente –Turquía (0.0321) y Siria (0.0350)– y una de Europa: Francia (0.0324).

La muestra “Neolítico de la Península Ibérica” es una de las más divergentes de todo el conjunto, superada únicamente por las poblaciones “Paleolítico”, Suecia, Saami y África del Sur. Su divergencia responde a su peculiar composición haplotípica. Como sucede en las muestras paleolítica y de África del Sur, la neolítica de la Península Ibérica presenta un porcentaje elevado de haplotipos no representados en el resto de poblaciones (43%). La frecuencia de los restantes haplotipos en el conjunto de poblaciones oscila entre el 0.1 y el 0.3% y solamente un individuo tiene el haplotipo mayoritario (CRS). La presencia de haplotipos únicos y de baja frecuencia sitúa a esta población entre las más distantes de todo el conjunto. Las poblaciones más próximas a “Neolítico” son también las más cercanas a “Neolítico de la Península Ibérica”: Valle del Nilo (0.0905), África del Oeste (0.0909), Siria (0.0937), Turquía (0.0943) y Francia

(0.0955), aunque, en este caso, hay que incluir a la población rusa del Norte del Cáucaso (0.0925). Las poblaciones actuales de la Península Ibérica (Andalucía, Cataluña, País Vasco y Portugal) divergen mucho de la muestra antigua procedente de la misma región geográfica.

Por su parte, y aunque alejada, la población “Neolítico de Próximo Oriente” tiene valores de distancia más cercanos al resto de las poblaciones que las otras dos muestras antiguas. Si bien los neolíticos de Próximo Oriente contienen un 50% de haplotipos únicos en la muestra, un 33% está presente con una frecuencia elevada en la mayor parte de las poblaciones restantes. La población actual más cercana es Francia (0.0495), seguida por Turquía (0.0522), Valle del Nilo (0.0522), África del Oeste (0.0523) y África del Este (0.0526). Dos poblaciones de la misma región geográfica (Siria y Jordania) y una de una zona próxima (Rusia Norte del Cáucaso) muestran valores de distancia pequeños respecto a esta población antigua. Sin embargo, las otras dos poblaciones actuales de Próximo Oriente (Drusos y Kurdos) aparecen más distantes.

La distancia de Reynolds *et. al.* 1983 tiene en cuenta la frecuencia de los diferentes haplotipos en cada pareja de poblaciones comparadas. Cuando un haplotipo sólo aparece en una de las dos poblaciones la magnitud de la distancia pasa a depender de su frecuencia en esa población. Cuando dos poblaciones comparten haplotipos la distancia entre ellas es menor, aunque también depende de la frecuencia de estos haplotipos en cada una de ellas. Como veremos en el apartado 6.3.3.2. de este capítulo, las muestras antiguas comparten muy pocos haplotipos con el resto de las poblaciones, y aquéllos compartidos son, generalmente, de baja frecuencia. Por ello, el conjunto de poblaciones estudiadas se diferencian, a grandes rasgos, de las poblaciones actuales según esta distancia. Ello nos permite hablar de diferencias entre la composición genética de las poblaciones actuales y las poblaciones del pasado aquí estudiadas.

Tabla R76. Matriz diagonal de las distancias genéticas de Reynolds (REYNOLDS *et al.* 1983) calculadas a partir de la información del fragmento total de 244pb entre 38 poblaciones actuales y 4 conjuntos de muestras antiguas. AL: Alemania; AUS: Austria; BUL: Bulgaria; CAN: Canarias; SAR: Cerdeña; FR: Francia; GAL: Galicia; TUS: Toscana; KUR: Kurdistan; SUEC: Suecia; PV: País Vasco; AFRC: África Centro; AFRS: África Sur; AFRE: África Este; ALB: Albania; AND: Andalucía; BEL: Bélgica; CAT: Cataluña; DEN: Dinamarca; DRUZ: Drusos Israel; EST: Estonia; FIN: Finlandia; GEO: Georgia; GB: Gran Bretaña; GRE: Grecia; SIC: Sicilia; ITSU: Italia del Sur; NOR: Noruega; JOR: Jordania; POR: Portugal; RKAR: Rusia Karelian; RNC: Rusia Norte del Cáucaso; SAA: Saami; SIR: Siria; SUIZ: Suiza; TUR: Turquía; NIL: Valle del Nilo; NEOL: Población “Neolítico”; PAL: Población “Paleolítico”; NEPI: Población “Neolítico de la Península Ibérica”; NEPO: Población “Neolítico de Próximo Oriente”.

	AL	AUS	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	KUR	SUEC	PV	AFRC	AFRS	AFRE	AFRO	ALB	AND	BEL	CAT	DEN
AL	0.0000																			
AUS	0.0166	0.0000																		
BUL	0.0547	0.0298	0.0000																	
CAN	0.0357	0.0200	0.0339	0.0000																
SAR	0.0189	0.0134	0.0422	0.0281	0.0000															
FR	0.0436	0.0213	0.0253	0.0219	0.0327	0.0000														
GAL	0.0123	0.0174	0.0559	0.0383	0.0151	0.0463	0.0000													
TUS	0.0305	0.0143	0.0272	0.0211	0.0224	0.0207	0.0289	0.0000												
KUR	0.0318	0.0208	0.0420	0.0308	0.0239	0.0303	0.0239	0.0269	0.0000											
SUEC	0.1397	0.1277	0.1358	0.1130	0.1430	0.1154	0.1514	0.1293	0.1401	0.0000										
PV	0.0297	0.0229	0.0476	0.0293	0.0252	0.0325	0.0285	0.0289	0.0342	0.1073	0.0000									
AFRC	0.1237	0.0937	0.0894	0.0842	0.1092	0.0777	0.1297	0.0871	0.1034	0.1773	0.1054	0.0000								
AFRS	0.1585	0.1285	0.1241	0.1189	0.1440	0.1124	0.1646	0.1219	0.1382	0.2119	0.1402	0.1570	0.0000							
AFRE	0.0729	0.0419	0.0363	0.0319	0.0580	0.0250	0.0788	0.0352	0.0518	0.1251	0.0542	0.0674	0.1043	0.0000						
AFRO	0.0457	0.0224	0.0271	0.0175	0.0337	0.0163	0.0496	0.0194	0.0333	0.1192	0.0350	0.0701	0.1047	0.0168	0.0000					
ALB	0.0344	0.0175	0.0322	0.0233	0.0274	0.0219	0.0347	0.0209	0.0303	0.1295	0.0317	0.0877	0.1224	0.0361	0.0218	0.0000				
AND	0.0645	0.0423	0.0468	0.0505	0.0548	0.0453	0.0670	0.0447	0.0562	0.1536	0.0627	0.1078	0.1425	0.0545	0.0435	0.0483	0.0000			
BEL	0.0504	0.0281	0.0261	0.0319	0.0381	0.0241	0.0503	0.0266	0.0373	0.1345	0.0434	0.0909	0.1256	0.0381	0.0280	0.0299	0.0484	0.0000		
CAT	0.0450	0.0411	0.0689	0.0522	0.0413	0.0561	0.0451	0.0494	0.0496	0.1646	0.0515	0.1300	0.1648	0.0790	0.0570	0.0516	0.0832	0.0633	0.0000	
DEN	0.0269	0.0206	0.0512	0.0377	0.0246	0.0420	0.0217	0.0288	0.0367	0.1426	0.0343	0.1213	0.1561	0.0705	0.0462	0.0323	0.0700	0.0451	0.0536	0.0000
DRUZ	0.0596	0.0395	0.0465	0.0435	0.0488	0.0402	0.0606	0.0397	0.0488	0.1471	0.0552	0.1024	0.1371	0.0494	0.0388	0.0441	0.0597	0.0458	0.0749	0.0617
EST	0.0515	0.0299	0.0335	0.0305	0.0410	0.0260	0.0540	0.0274	0.0427	0.1333	0.0414	0.0872	0.1219	0.0352	0.0254	0.0268	0.0594	0.0328	0.0660	0.0483
FIN	0.0233	0.0107	0.0264	0.0172	0.0193	0.0178	0.0250	0.0140	0.0251	0.1145	0.0221	0.0851	0.1199	0.0332	0.0175	0.0157	0.0427	0.0244	0.0454	0.0249
GEO	0.0319	0.0173	0.0308	0.0207	0.0249	0.0233	0.0333	0.0196	0.0293	0.1149	0.0277	0.0866	0.1213	0.0349	0.0207	0.0243	0.0446	0.0323	0.0513	0.0351
GB	0.0282	0.0118	0.0253	0.0175	0.0211	0.0181	0.0281	0.0124	0.0276	0.1176	0.0232	0.0831	0.1179	0.0313	0.0166	0.0170	0.0455	0.0244	0.0487	0.0224
GRE	0.0340	0.0171	0.0300	0.0230	0.0257	0.0216	0.0339	0.0196	0.0305	0.1278	0.0288	0.0869	0.1216	0.0346	0.0203	0.0221	0.0459	0.0327	0.0529	0.0396
SIC	0.0218	0.0125	0.0331	0.0195	0.0174	0.0228	0.0227	0.0176	0.0246	0.1133	0.0208	0.0933	0.1281	0.0415	0.0234	0.0234	0.0442	0.0327	0.0447	0.0303
ITSU	0.0252	0.0137	0.0352	0.0245	0.0204	0.0278	0.0264	0.0193	0.0281	0.1351	0.0269	0.0955	0.1303	0.0440	0.0251	0.0221	0.0484	0.0344	0.0460	0.0314
NOR	0.0180	0.0072	0.0285	0.0160	0.0139	0.0188	0.0186	0.0116	0.0215	0.1219	0.0203	0.0870	0.1218	0.0355	0.0173	0.0149	0.0431	0.0264	0.0409	0.0214
JOR	0.0768	0.0463	0.0393	0.0377	0.0622	0.0289	0.0836	0.0407	0.0545	0.1299	0.0572	0.0762	0.1108	0.0229	0.0239	0.0393	0.0564	0.0372	0.0796	0.0720
POR	0.0183	0.0108	0.0310	0.0238	0.0162	0.0265	0.0182	0.0187	0.0245	0.1301	0.0247	0.1004	0.1352	0.0485	0.0277	0.0218	0.0442	0.0307	0.0445	0.0272
RKAR	0.0287	0.0166	0.0293	0.0212	0.0248	0.0213	0.0318	0.0193	0.0293	0.1139	0.0269	0.0880	0.1228	0.0362	0.0214	0.0227	0.0479	0.0264	0.0504	0.0346

Tabla R76. (Continuación).

	DRUZ	EST	FIN	GEO	GB	GRE	SIC	ITSU	NOR	JOR	POR	RKAR	RNC	SAA	SIR	SUIZ	TUR	NIL	NEOL	PAL	NEPI	NEPO
AL																						
AUS																						
BUL																						
CAN																						
SAR																						
FR																						
GAL																						
TUS																						
KUR																						
SUEC																						
PV																						
AFRC																						
AFRS																						
AFRE																						
AFRO																						
ALB																						
AND																						
BEL																						
CAT																						
DEN																						
DRUZ	0.0000																					
EST	0.0510	0.0000																				
FIN	0.0388	0.0233	0.0000																			
GEO	0.0423	0.0318	0.0161	0.0000																		
GB	0.0390	0.0216	0.0095	0.0159	0.0000																	
GRE	0.0425	0.0289	0.0179	0.0225	0.0177	0.0000																
SIC	0.0425	0.0335	0.0136	0.0181	0.0164	0.0189	0.0000															
ITSU	0.0447	0.0329	0.0159	0.0220	0.0172	0.0232	0.0179	0.0000														
NOR	0.0380	0.0242	0.0071	0.0138	0.0083	0.0142	0.0110	0.0124	0.0000													
JOR	0.0531	0.0363	0.0371	0.0398	0.0355	0.0413	0.0475	0.0483	0.0405	0.0000												
POR	0.0428	0.0353	0.0142	0.0214	0.0169	0.0218	0.0145	0.0171	0.0116	0.0529	0.0000											
RKAR	0.0418	0.0264	0.0088	0.0201	0.0151	0.0202	0.0193	0.0227	0.0111	0.0383	0.0194	0.0000										

Tabla R76. (Continuación).

	AL	AUS	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	KUR	SUEC	PV	AFRC	AFRS	AFRE	AFRO	ALB	AND	BEL	CAT	DEN
RNC	0.0340	0.0141	0.0236	0.0168	0.0243	0.0161	0.0351	0.0155	0.0276	0.1212	0.0256	0.0756	0.1103	0.0232	0.0122	0.0186	0.0437	0.0255	0.0501	0.0332
SAA	0.1439	0.1230	0.1221	0.1052	0.1410	0.1039	0.1553	0.1196	0.1353	0.0288	0.1105	0.1558	0.1904	0.1031	0.1029	0.1189	0.1401	0.1231	0.1618	0.1440
SIR	0.0497	0.0256	0.0267	0.0251	0.0396	0.0196	0.0547	0.0251	0.0347	0.1242	0.0390	0.0756	0.1102	0.0232	0.0165	0.0273	0.0460	0.0303	0.0624	0.0511
SUIZ	0.0594	0.0410	0.0470	0.0373	0.0510	0.0324	0.0627	0.0412	0.0490	0.0962	0.0438	0.1010	0.1357	0.0484	0.0388	0.0388	0.0722	0.0425	0.0726	0.0512
TUR	0.0505	0.0244	0.0266	0.0213	0.0371	0.0174	0.0523	0.0205	0.0366	0.1213	0.0358	0.0719	0.1066	0.0193	0.0136	0.0224	0.0465	0.0260	0.0609	0.0461
NIL	0.0429	0.0205	0.0259	0.0178	0.0321	0.0154	0.0468	0.0185	0.0310	0.1182	0.0333	0.0693	0.1043	0.0155	0.0090	0.0208	0.0417	0.0268	0.0553	0.0444
NEOL	0.0767	0.0488	0.0469	0.0422	0.0617	0.0324	0.0793	0.0421	0.0549	0.1390	0.0571	0.0880	0.1226	0.0344	0.0311	0.0457	0.0644	0.0469	0.0840	0.0747
PAL	0.1872	0.1573	0.1531	0.1438	0.1727	0.1371	0.1932	0.1507	0.1592	0.2410	0.1690	0.1862	0.2208	0.1309	0.1314	0.1513	0.1715	0.1546	0.1935	0.1848
NEPI	0.1234	0.1016	0.1088	0.0992	0.1129	0.0955	0.1266	0.0979	0.1054	0.1996	0.1120	0.1513	0.1860	0.0992	0.0909	0.1020	0.1250	0.1089	0.1356	0.1252
NEPO	0.1053	0.0732	0.0645	0.0654	0.0866	0.0495	0.1063	0.0640	0.0796	0.1590	0.0787	0.1069	0.1415	0.0526	0.0523	0.0682	0.0830	0.0642	0.1090	0.1005

Tabla R76. (Continuación).

	DRUZ	EST	FIN	GEO	GB	GRE	SIC	ITSU	NOR	JOR	POR	RKAR	RNC	SAA	SIR	SUIZ	TUR	NIL	NEOL	PAL	NEPI	NEPO
RNC	0.0373	0.0225	0.0108	0.0136	0.0099	0.0169	0.0178	0.0181	0.0105	0.0288	0.0200	0.0150	0.0000									
SAA	0.1351	0.1183	0.1062	0.1084	0.1092	0.1132	0.1114	0.1279	0.1128	0.1091	0.1272	0.0987	0.1085	0.0000								
SIR	0.0420	0.0301	0.0213	0.0254	0.0215	0.0249	0.0278	0.0312	0.0224	0.0261	0.0303	0.0238	0.0161	0.1083	0.0000							
SUIZ	0.0625	0.0453	0.0353	0.0410	0.0357	0.0435	0.0396	0.0485	0.0381	0.0488	0.0455	0.0406	0.0377	0.0973	0.0421	0.0000						
TUR	0.0408	0.0240	0.0173	0.0217	0.0160	0.0225	0.0254	0.0278	0.0186	0.0229	0.0297	0.0212	0.0129	0.1046	0.0174	0.0370	0.0000					
NIL	0.0357	0.0248	0.0162	0.0188	0.0154	0.0192	0.0213	0.0237	0.0159	0.0222	0.0255	0.0200	0.0110	0.1026	0.0151	0.0373	0.0124	0.0000				
NEOL	0.0545	0.0463	0.0419	0.0446	0.0404	0.0400	0.0437	0.0513	0.0423	0.0405	0.0528	0.0437	0.0350	0.1205	0.0350	0.0548	0.0321	0.0307	0.0000			
PAL	0.1615	0.1509	0.1487	0.1502	0.1444	0.1459	0.1535	0.1591	0.1506	0.1400	0.1600	0.1517	0.1369	0.2196	0.1350	0.1522	0.1326	0.1305	0.1223	0.0000		
NEPI	0.1152	0.1065	0.0968	0.1000	0.0969	0.0988	0.0966	0.1022	0.0959	0.1057	0.1072	0.1012	0.0925	0.1843	0.0937	0.1196	0.0943	0.0905	0.0532	0.1737	0.0000	
NEPO	0.0715	0.0660	0.0655	0.0690	0.0639	0.0603	0.0672	0.0772	0.0674	0.0575	0.0776	0.0669	0.0579	0.1389	0.0557	0.0733	0.0522	0.0522	0.0237	0.1557	0.1228	0.0000

6.3.1.1. Reconstrucción filogenética a partir de distancias genéticas

Las figuras **FR64** y **FR65** muestran respectivamente los árboles de Neighbor-Joining y de Fitch-Margoliash reconstruidos a partir de la matriz de distancias de Reynolds (**Tabla R76**) de acuerdo con lo descrito en el apartado 16.5.1. del capítulo “Métodos”.

En estos dos árboles sin raíz pueden distinguirse cuatro grupos: el formado por las tres poblaciones antiguas “Paleolítico”, “Neolítico Próximo Oriente” y “Neolítico Península Ibérica”, claramente distanciado del conjunto restante; el constituido por algunas poblaciones Africanas: África del Este y África del Sur en la reconstrucción de Neighbor-Joining y África del Sur, y África Centro en el árbol de Fitch-Margoliash; el clado altamente divergente que incluye al grupo Saami junto con País Vasco en el árbol de Neighbor-Joining y con Suecia en el de Fitch-Margoliash; y el formado por el conjunto restante de poblaciones.

Según se deducía de los valores de la matriz de distancias, la mayor parte de las poblaciones europeas están muy poco diferenciadas y se agrupan en ambos árboles formando un clado más o menos homogéneo, del que sobresalen notablemente las poblaciones anteriormente mencionadas. En el árbol de Neighbor-Joining las poblaciones actuales de Próximo Oriente aparecen dentro del entramado de poblaciones europeas, mientras que en el de Fitch-Margoliash ocupan una posición intermedia entre el clado africano más divergente –que como ya hemos comentado está constituido por África del Sur y África Centro– y el conjunto europeo.

Es destacable en ambos métodos de reconstrucción la separación de las poblaciones antiguas de las poblaciones actuales y su proximidad a ciertas poblaciones africanas como la del Valle del Nilo.



En los árboles filogenéticos con raíz (**Figura FR66**) las poblaciones se unen por sus valores de divergencia, siguiendo el orden que observábamos en los **gráficos FR60-FR63**. Algunas de las poblaciones que aparecían en el entramado europeo en los árboles sin raíz se sitúan, ahora, próximas a la base del árbol, como es el caso de Cataluña, Andalucía y el grupo Druso de Israel. La mayoría de poblaciones de Próximo Oriente y algunas poblaciones africanas (África del Oeste, Valle del Nilo y África del Este) y europeas (Francia, Estonia, Bulgaria y Bélgica) forman aquí un clado relacionado con la mayor parte de las poblaciones europeas y que ocupa una posición intermedia entre éstas y el conjunto restante más divergente.

Es importante destacar que una de las asunciones de este método de reconstrucción filogenética –la contemporaneidad de las poblaciones–, no se cumple en nuestro caso. Sin embargo, los grupos más antiguos ocupan una posición cercana a la base del árbol, inmediatamente posterior a las poblaciones Saami y Suecia.

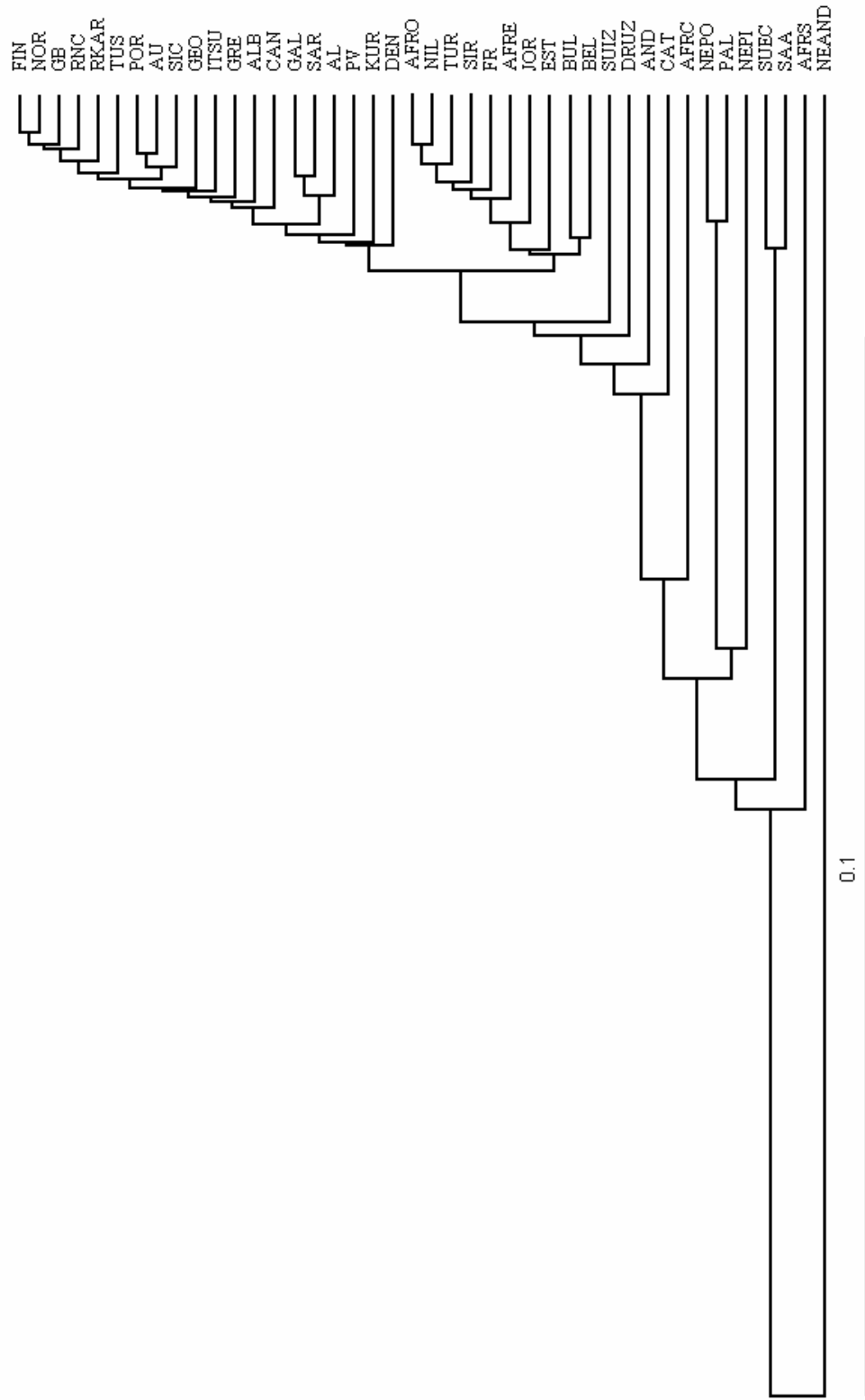


Figura FR66. Árbol filogenético con raíz construido mediante el método de UPGMA a partir de la matriz de distancias de Reynolds (REYNOLDS *et al.* 1983) de la **Tabla R76** utilizando como outgroup la población “Neandertal”, compuesta por tres secuencias de la región analizada de tres Neandertales (KRINGS *et al.* 1997; OVCHINNIKOV *et al.* 2000 y KRINGS *et al.* 2000).

6.3.2. Clusters

En la **Tabla R77** se muestran aquellas poblaciones actuales que se unen –dado un determinado valor de ε – a los conjuntos de secuencias antiguas “Calcolítico” (CALC), “Paleolítico-Neolítico Península Ibérica” (NEPI), “Neolítico Próximo Oriente” (NEPO) y “Mari” (MARI) para la media de las diferencias por parejas. El estadístico ε y los diferentes grupos de secuencias antiguas se describen adecuadamente en los apartados 16.6.1. y 16.6.2. del capítulo “Métodos”.

En general, para valores pequeños de ε se mantiene el orden en el que se unen las poblaciones actuales a las cuatro poblaciones antiguas. Así sucede con las poblaciones de Galicia, País Vasco y Dinamarca. De todo el conjunto de poblaciones, éstas son las que presentan el menor número medio de mutaciones (**Tabla R78**). Por otra parte, hay otras que nunca llegan a unirse a las cuatro poblaciones antiguas según los valores de ε calculados, como sucede con las poblaciones africanas (África del Sur, África del Este, África del Oeste y Valle del Nilo) y con la población de Jordania. Estas poblaciones presentan el número medio de mutaciones interno más elevado (**Tabla R78**).

El **Gráfico FR67** muestra que existe una relación entre el número medio de mutaciones de cada población –cociente entre el número total de mutaciones de las secuencias de la población y el número de secuencias– y los valores de ε a los que éstas se unen a las cuatro poblaciones antiguas. La relación entre ambas variables se ajusta en los cuatro casos a una regresión lineal (Calcolítico, $r^2=0.84$; Nerja-Pirulejo, $r^2=0.9026$; Neolítico Próximo Oriente, $r^2=0.8983$; Mari, $r^2=0.9185$). Este efecto puede enmascarar la existencia de diferencias o similitudes reales entre las poblaciones y debe ser tenido en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Sin embargo, en aquellos casos en los que una población con un número medio de mutaciones elevado se une a otra con valores pequeños de ε , el orden de unión refleja ciertamente una similitud real. Esto ocurre, por ejemplo, entre las poblaciones “Calcolítico” y la población “Neolítico de Próximo Oriente”, las cuales, a pesar de presentar un número medio de mutaciones intermedio, se unen respectivamente a valores bajos de ε . La población antigua de Mari muestra, en este sentido, una similitud con la población “Calcolítico” que no puede

atribuirse a la relación mencionada. Contrariamente, las poblaciones Suecia y Saami, a pesar de presentar un número medio de mutaciones entre bajo e intermedio, se unen a valores elevados de ϵ a la población “Calcolítico”, lo que probablemente refleja la existencia de profundas diferencias entre ellas.

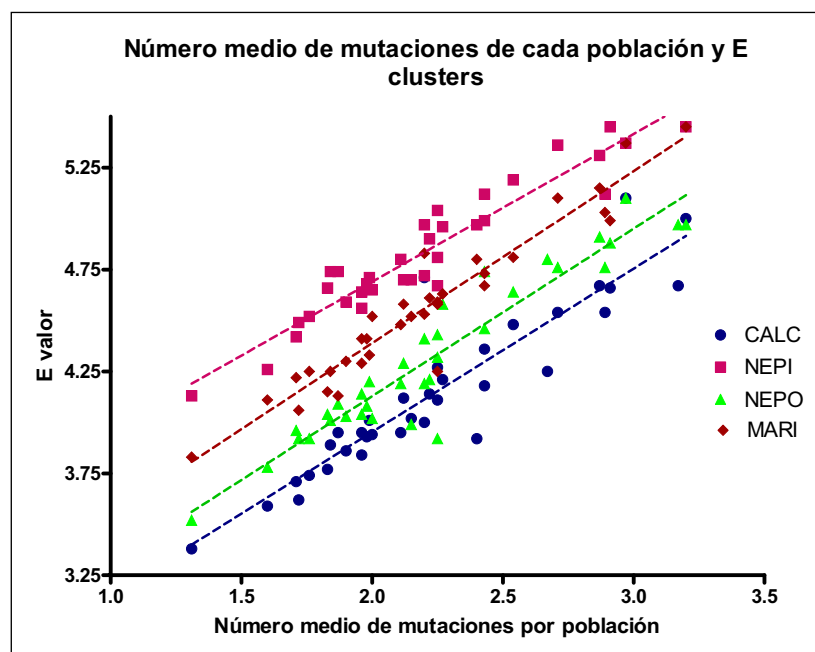
Tabla R77. Unión de las poblaciones actuales a las cuatro poblaciones antiguas: “Calcolítico” (CALC), “Nerja-Pirulejo” (NEPI), “Neolítico Próximo Oriente” (NEPO) y “Mari” (MARI) a valores crecientes de ϵ .

ϵ	CAL	NEPI	NEPO	MARI	ϵ	CAL	NEPI	NEPO	MARI
3.38	GAL				4.42		SUIZ		
3.52			GAL		4.43			RNC	
3.59	PV				4.46			TUS	
3.62	DEN				4.48	GEO			GRE
3.71	SUIZ				4.49		DEN		
3.74	POR				4.52		POR		KUR BEL
3.77	AL				4.53				BUL
3.78			PV		4.54	DRUZ SIR			
3.83				GAL	4.56		SAR		
3.84	SAR				4.58			EST	AUS ALB
3.86	NOR				4.59		NOR		RNC
3.89	SIC				4.61				FR
3.92	NEPO		DEN POR CAT		4.63				EST
3.93	GB				4.64		FIN	GEO	
3.94	BEL				4.65		BEL		
3.95	GRE FIN CAT				4.66	TUR	AL		
3.96			SUIZ		4.67	NEPI CAN	CAL		TUS
3.99			KUR		4.68		GB		
4.00	BUL				4.69				
4.01	RKAR		SIC		4.70		KUR ALB		
4.02	KUR		BEL		4.71	SUEC	RKAR		
4.03			NOR		4.72		BUL		
4.04			AL SAR		4.73				ITSU
4.06				DEN	4.74		SIC CAT	ITSU	
4.08			GB		4.76			SIR DRUZ	
4.09			CAT		4.80		GREC	MARI	NEPO
4.11	AUS			PV	4.81		AUS		GEOR
4.12	ALB				4.83				SUEC
4.13		GAL		CAT	4.88			TUR	
4.14	FR		FIN		4.90		FR		
4.15				AL	4.91			CAN	
4.18	TUS				4.96		EST		
4.19			BUL GRE		4.97		NEPO SUEC	NEPI AND	
4.20			RKAR		4.99		TUS		TUR
4.21	EST		FR		5.00	AND			
4.22				SUIZ	5.03				DRUZ
4.25	MARI			POR SIC CAL	5.04		RNC		
4.26		PV			5.10	SAA		SAA	SIR
4.27	RNC				5.12		ITSU DRUZ		
4.29			ALB	FIN	5.15				CAN
4.30				NOR	5.19		GEO		
4.32			AUS		5.31		CAN		
4.33				RKAR	5.36		SIR		
4.36	ITSU				5.37		SAR		SAA
4.41			SUEC	SAR GB	5.45		AND TUR		AND

Tabla R78. Número medio de mutaciones (NM) de cada población y varianza asociada (Var).

Población	NM	Var	Población	NM	Var	Población	NM	Var
GAL	1.31	1.99	GRE	2.11	3.08	MARI	2.67	3.22
PV	1.60	1.88	ALB	2.12	4.68	SIR	2.71	2.37
SUIZ	1.71	1.03	KUR	2.15	2.27	CAN	2.87	5.19
DEN	1.72	2.39	SUEC	2.20	2.88	DRUZ	2.89	3.52
POR	1.76	2.55	BUL	2.20	2.56	TUR	2.91	3.39
AL	1.83	2.35	FR	2.22	2.21	SAA	2.97	4.10
SIC	1.84	2.23	AUS	2.25	3.43	NEPI	3.17	4.81
CAT	1.87	1.58	RNC	2.25	2.78	AND	3.20	3.89
NOR	1.90	2.49	CALC	2.25	2.19	JOR	3.83	3.42
SAR	1.96	3.09	EST	2.27	2.74	AFRO	4.09	6.70
FIN	1.96	2.05	NEPO	2.40	1.84	NIL	5.19	9.93
GB	1.98	2.56	TUS	2.43	2.78	AFRE	6.31	9.71
RKAR	1.99	2.49	ITSU	2.43	5.06	AFRS	8.53	0.67
BEL	2.00	2.00	GEO	2.54	4.58	AFRC	9.76	2.25

La población “Neolítico de Próximo Oriente” muestra una gran similitud con la población Kurda –además de con la población “Calcolítico”–, que no puede atribuirse a la relación entre el número medio de mutaciones y los valores de ϵ . Entre las restantes poblaciones resulta muy difícil evaluar la existencia de diferencias y/o similitudes claras pues no existen valores que se alejen de la tendencia general.

**Gráfico FR67.** Relación entre el número medio de mutaciones de cada población y los valores de ϵ de unión de las poblaciones actuales a las cuatro poblaciones antiguas.

6.3.3. Haplotipos

6.3.3.1. Reconstrucción filogenética a partir de haplotipos

6.3.3.1.1. Neighbor-Joining y UPGMA

En la **Figura FR68** se muestra el árbol Neighbor-Joining construido a partir de la matriz de distancias Tamura-Nei, con parámetro $\gamma=0,47$, entre 170 haplotipos de poblaciones actuales –con frecuencia absoluta mayor a dos– y los de 35 muestras antiguas (**Tabla R62**). En la **Tabla R79** se resume la distribución y frecuencia de los haplotipos en las diferentes poblaciones. Además, se indican las mutaciones respecto a la secuencia consenso que caracterizan a cada haplotipo, así como el haplogrupo mitocondrial al que pertenece. La asignación de haplogrupo se realizó de forma previa a la construcción del árbol, siguiendo la clasificación de RICHARDS *et al.* 2000. Las líneas que no pudieron ser clasificadas mediante este criterio se les asignó el haplogrupo de la publicación original. Los casos en que un mismo haplotipo pueda pertenecer a diferentes haplogrupos se señalan convenientemente. El total de haplotipos clasificados ha sido 170, quedando únicamente 14 sin determinar.

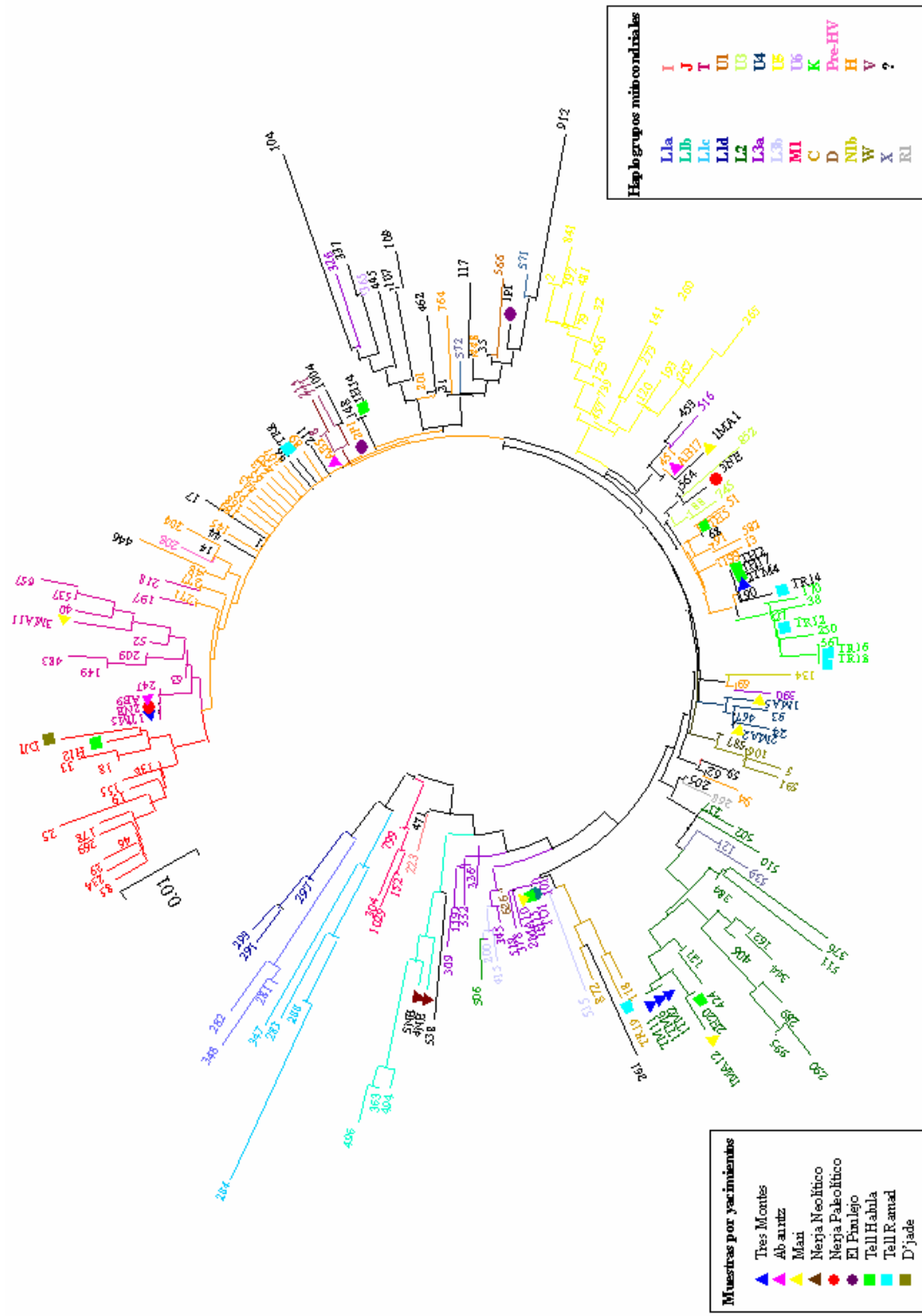


Figura FR68. Árbol filogenético de Neighbor-Joining construido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei con parámetro $\gamma=0.47$ para los haplotipos de población actual de frecuencia absoluta superior a 2 y con las 35 secuencias antiguas obtenidas.

Tabla R79. Distribución y frecuencia de todos los haplotipos de población antigua y de aquellos de frecuencia superior a dos de población actual en las diferentes poblaciones actuales y antiguas estudiadas. Se indican las mutaciones del fragmento estudiado respecto a la secuencia consenso que caracterizan a cada haplotipo (+16000) y el haplogrupo o haplogrupos mitocondriales al que pertenecen. F. Rel: Frecuencia relativa. F. Abs: Frecuencia absoluta. AL: Alemania; AUS: Austria; BUL: Bulgaria; CAN: Canarias; SAR: Cerdeña; FR: Francia; GAL: Galicia; TUS: Toscana; KUR: Kurdistán; SUEC: Suecia; PV: País Vasco; AFRC: África Centro; AFRS: África Sur; AFRE: África Este; AFRO: África Oeste; ALB: Albania; AND: Andalucía; BEL: Bélgica; CAT: Cataluña; DEN: Dinamarca; DRUZ: Drusos Israel; EST: Estonia; FIN: Finlandia; GEO: Georgia; GB: Gran Bretaña; GRE: Grecia; SIC: Sicilia; ITSU: Italia del Sur; NOR: Noruega; JOR: Jordania; POR: Portugal; RKAR: Rusia Karelian; RNC: Rusia Norte del Cáucaso; SAA: Saami; SIR: Siria; SUJZ: Suiza; TUR: Turquía; NIL: Valle del Nilo; NEOL: Neolítico; PAL: Paleolítico; NEPI: Neolítico de la Península Ibérica; NEPO: Neolítico de Próximo Oriente.

Nº	Haplotipo	Haplogrupo	F. Rel.	F. Abs.	AL	AUS	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	KUR	SUEC	PV
872	129A,223T,298C,327T	C	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
118	223T,298C,325C,327T	C	0.001	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
TR19	224C,298C,325C,327T	C	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
626	223T,362C	D	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	129A,223T	G/I	0.006	18	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
471	129A,223T,311C	G/I	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	162G	H	0.007	19	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
89	354T	H	0.005	14	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
271	291T	H	0.004	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
13	293G,311C	H	0.003	8	1	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
94	129A,316G	H	0.003	8	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
451	256T	H	0.002	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
184	263C	H	0.002	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
99	260T	H	0.002	6	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
443	134T	H	0.002	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	248T	H	0.002	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
201	172C	H	0.002	6	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
199	293G	H	0.002	6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
48	218T	H	0.002	5	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
446	218T,328A,362C	H	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	207G	H	0.002	5	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
91	261T	H	0.002	5	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
213	240G	H	0.001	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
207	239T	H	0.001	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
277	176T	H	0.001	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
204	288C,362C	H	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
145	257T	H	0.001	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
168	287T	H	0.001	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
450	209C	H	0.001	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
764	189C,234T,325C	H	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla R79. (Continuación).

N°	Haplotipo	Haplogrupo	F. Rel.	F. Abs.	AL	AUS	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	KUR	SUEC	PV
448	189C,356C	H	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	266T,311C	H	0.001	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
582	261T,311C	H	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	145A	H	0.001	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
148	304C	H/HV*	0.011	31	0	0	0	0	1	1	2	1	0	0	3
96	355T	H/HV1	0.003	9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
62	129A	H/HV*/HV1	0.011	32	0	1	0	0	2	0	4	0	0	0	2
564	192T	H/HV*/HV1	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
190	224C	H/K	0.003	8	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
1	CRS	H/U	0.130	367	13	23	3	8	19	5	31	9	6	2	10
31	189C	H/U*	0.011	30	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1
211	221T	H/U*	0.001	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
205	278T	H/U*	0.001	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
587	292T	H/W	0.002	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	362C	H/HV*/pre-HV/R*/U*	0.008	22	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
68	311C	H/HV*/R*/R2/U	0.015	41	0	2	1	1	3	3	2	0	2	1	2
44	274A	H/HV1/U*	0.003	8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	309G,318T	H?	0.001	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TR8	147A	H?	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
223	129A,172C,223T,311C	I	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
63	126C	J	0.021	58	0	2	2	1	1	1	3	3	0	0	0
247	126C,311C	J	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
197	126C,291T	J	0.001	4	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
218	126C,176T	J	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
52	126C,261T	J1	0.003	8	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
40	126C,145A,231C,261T	J1a	0.004	11	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0
3MA11	126C,145A,231C,356C	J1a	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
537	126C,145A,222T,261T	J1b	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
657	126C,145A,172C,222T,261T	J1b1	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
149	126C,193T,278T	J2	0.002	6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
209	126C,193T	J2	0.001	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
483	126C,193T,278T,356C	J2	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	224C,311C	K	0.018	50	1	4	3	0	2	2	3	2	1	0	0

Tabla R79. (Continuación).

Nº	Haplotipo	Haplogrupo	F. Rel.	F. Abs.	AL	AUS	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	KUR	SUEC	PV
38	224C,311C,362	K	0.001	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
170	129A,224C,311C	K	0.001	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
250	224C,260T,311C	K	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
567	224C,311C,366T	K	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
348	129A,148T,168T,172C,187T,188G,189C,223T,230G,311C,320T	L1a	0.006	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
282	148T,172C,187T,188A,189C,223T,230G,242T,311C,320T	L1a	0.002	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
281	148T,172C,187T,188G,189C,223T,230G,311C,320T	L1a	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
363	126C,187T,189C,223T,264T,270T,278T,293G,311C	L1b	0.008	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
496	126C,145A,187T,189C,223T,264T,270T,278T,293G,311C	L1b	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
494	126C,145A,187T,189C,223T,264T,270T,278T,311C	L1b	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4NE	129A,264T,270T,278T,293G,311C	L1b	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5NE	126C,264T,270T,278T,293G,311C	L1b	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
347	129A,148T,166G,187T,189C,223T,233G,254G,278T,360T	L1c	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
283	129A,184T,187T,189C,223T,278T,294T,301T,311C,360T	L1c	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
284	129A,187T,189C,223T,274A,278T,293G,294T,311C,360T	L1c	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
288	129A,187T,189C,223T,274A,278T,293G,294T,311C,360T	L1c	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
291	129A,187T,189C,223T,230G,239T,243C,294T,311C	L1d	0.002	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
293	129A,153A,187T,189C,223T,230G,243C,294T,311C	L1d	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
297	129A,187T,189C,223T,230G,243C,311C	L1d	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	129A,163G,172C,219G,311C	L1i	0.001	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
237	223T,278T	L2	0.007	20	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
502	223T,234T,278T	L2	0.004	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
344	189C,192T,223T,278T,294T,309G	L2	0.003	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121	223T,278T,294T,309G	L2	0.003	8	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
510	223T,261T,278T,318G	L2	0.002	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
511	148T,150T,223T,278T,294T,355T	L2	0.002	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
995	189C,223T,229C,278T,291T,294T,311C	L2	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
376	209C,223T,278T,294T,301T,354T	L2	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290	172C,189C,223T,229C,278T,291T,294T,311C	L2	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
506	187T,223T,278T,362C	L2	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
424	213A,223T,278T,294T,309G	L2	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
289	170G,189C,223T,229C,278T,294T,311C	L2	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
406	189C,223T,278T,294T,309G	L2	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
162	189C,192T,223T,278T,294T	L2	0.001	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Tabla R79. (Continuación).

N°	Haplotipo	Haplogrupo	F. Rel.	F. Abs.	AL	AUS	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	KUR	SUEC	PV
384	223T,278T,294T	L2	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1TM2 1TM6 TMI1	261T,278T,294T,309G	L2	0.000	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2H20	223T,261T,278T,294T,309G	L2	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1MA12	223T,256T,261T,278T,294T,309G	L2	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
462	172C,174T,304C	L3	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	223T	L3a	0.006	18	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
309	209C,223T,292T,311C	L3a	0.002	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
119	209C,223T,311C	L3a	0.002	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
519	223T,264T	L3a	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
378	223T,320T	L3a	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
516	223T,256T,368C	L3a	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
336	223T,311C	L3a	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
390	145A,222T	L3a	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
326	172C,183C,189C,223T,320T	L3a	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
332	223T,311C,354T	L3a	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
345	223T,311C,362C	L3a	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	223T,278T,362C	L3b	0.006	17	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
415	223T,278T,311C,362C	L3b	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
515	166G,215G,223T,325C	L3b	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
152	129A,189C,223T,249C,311C,359C	M1	0.002	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1029	129A,183C,189C,223T,249C,311C,359C	M1	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
799	129A,189C,223T,249C,311C	M1	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
304	129A,182C,183C,189C,223T,249C,311C	M1	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
134	145A,176G,223T	N1b	0.002	6	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
208	126C,362C	pre-HV	0.005	13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
268	278T,311C	R1	0.003	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
46	126C,294T,296T	T	0.006	16	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
136	126C,294T	T	0.001	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
178	126C,189C,294T,296T	T	0.001	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
25	126C,163G,186T,189C,294T	T1	0.009	24	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
18	126C,294T,304C	T2	0.004	10	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
33	126C,172C,294T,304C	T2	0.001	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	126C,294T,296T,304C	T2	0.010	29	2	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0
H12	266T,294T,304C	T2?	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla R79. (Continuación).

N°	Haplotipo	Haplogrupo	F. Rel.	F. Abs.	AL	AUS	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	KUR	SUEC	PV
D11	218T,294T,304C,320T	T2?	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
155	126C,292T,294T	T3	0.005	14	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
85	126C,292T,294T,296T	T3	0.002	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
234	126C,294T,296T,324C	T4	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
19	126C,153A,294T	T5	0.002	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
269	126C,153A,294T,296T	T5	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
566	183C,189C,249C,261T	U1a	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	343G	U3	0.004	11	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
852	168T,192T,343G	U3	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
745	311C,343G	U3	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
453	223T,256T,311C	U3?	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
467	356C	U4	0.005	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	179T,356C	U4	0.002	5	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0
93	356C,362C	U4	0.002	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1MA5	223T, 356C	U4	0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
123	256T,270T	U5	0.005	15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
457	270T	U5	0.002	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
456	256T,270T,311C	U5	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
739	270T,311C	U5	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
273	192T,270T,319A	U5a	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
141	169A,192T,235G,270T	U5a	0.001	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
79	192T,256T,270T	U5a1	0.006	18	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	192T,256T,270T,294T	U5a1	0.002	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	192T,256T,270T,311C	U5a1	0.002	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
481	192T,256T,270T,291T	U5a1	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
192	192T,256T,270T,362C	U5a1	0.001	4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
841	192T,256T,270T,271C,294T	U5a1	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	189C,270T	U5b	0.005	15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
193	189C,192T,270T	U5b	0.004	12	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
260	144C,189C,270T	U5b1	0.013	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
265	144C,148T,189C,270T,335G	U5b1	0.004	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
262	144C,148T,189C,270T	U5b1	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
365	172C,189C,219G,278T	U6a1	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	298C	V	0.026	72	2	1	0	2	0	1	2	0	0	11	4

Tabla R79. (Continuación).

N°	Haplotipo	Haplogrupo	F. Rel.	F. Abs.	AL	AUS	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	KUR	SUEC	PV
771	153A,298C	V	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215	218G,298C	V	0.001	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
106	223T,292T	W	0.004	12	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
5	223T,292T,295T	W	0.002	6	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
591	223T,234T,292T	W	0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
571	126C,183C,189C,223T,278T	X	0.003	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	189C,223T,278T	X	0.002	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
572	189C,278T	X	0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
539	189C,223T,255A,278T	X	0.001	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	163G,172C,219G,311C		0.003	9	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
35	183C,189C		0.002	7	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
1004	129A,153A		0.002	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
337	172C,183C,189C,219G,278T		0.002	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
445	129A,169T,172C,189C		0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
912	126C,136C,182C,183C,189C,223T,360T,362C		0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	172C,183C,189C,270T,274A,311C,325C,357C		0.002	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
261	129A,185T,223T,224C,260T,298C		0.002	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
538	129A,223T,264T,270T,311C,319A,362C		0.001	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117	183C,189C,257T,356C		0.001	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
1MA1	256T,297C		0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TR14	224C,293C		0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3NE	192T,311C		0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IPI	182C,183C,189C		0.000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla R79. (Continuación).

Nº	NEPO	NEPI	PAL	NEOL	NIL	TUR	SUIZ	SIR	SAA	RNC	RKAR	POR	JOR	NOR	ITSU	SIC	GRE	GB	GEO	FIN	EST	DRUZ	DEN	CAT	BEL	AND	ALB	AFRO	AFRE	AFRS	AFRC
872	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
TR19	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
626	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
471	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	0	0	0	1	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
271	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
451	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
443	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
201	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
446	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
207	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
277	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
764	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
448	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
582	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla R79. (Continuación).

	N°	AFRC	AFRS	AFRE	AFRO	ALB	AND	BEL	CAT	DEN	DRUZ	EST	FIN	GEO	GB	GRE	SIC	ITSU	NOR	JOR	POR	RKAR	RNC	SAA	SIR	SUIZ	TUR	NIL	NEOL	PAL	NEPI	NEPO			
	148	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3	0	2	1	0	5	0	0	0	3	1	1	1	0	2	0	1	0	0	1			
	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	62	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	1	1	4	1	0	2	0	0	0	0	8	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
	564	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0			
	190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	2			
	1	0	0	0	10	7	2	2	4	8	6	3	27	10	14	7	13	8	48	0	14	13	28	0	2	2	2	4	6	1	0	1	0		
	31	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	2	3	0	2	1	1	2	0	2	2	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
	211	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
	587	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	14	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	3	0	0	1	1	0	1	0	0	5	0	0	0	0	0		
	68	0	0	0	1	2	0	2	1	2	1	1	2	0	0	0	1	0	1	2	1	2	0	1	1	2	1	0	1	0	0	1	0	1	
	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0		
	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
	TR8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
	223	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	63	0	0	0	1	2	0	2	0	3	1	2	6	1	6	0	0	1	7	1	1	2	4	0	0	0	1	3	1	0	0	0	0	0	
	247	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	
	197	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	218	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	52	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
	40	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3MA11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	537	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	657	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	149	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	483	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	27	0	0	1	5	0	2	2	0	0	3	0	2	1	1	2	2	1	2	0	3	1	1	0	1	0	0	2	1	0	0	1	0	0	1
	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	170	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	567	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	
	348	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	

Tabla R79. (Continuación).

N°	AFRC	AFRS	AFRE	AFRO	ALB	AND	BEL	CAT	DEN	DRUZ	EST	FIN	GEO	GB	GRE	SIC	ITSU	NOR	JOR	POR	RKAR	RNC	SAA	SIR	SUIZ	TUR	NIL	NEOL	PAL	NEPI	NEPO
282	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
281	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
363	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
496	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
494	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4NE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
5NE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
347	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
283	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
284	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
288	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
291	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
293	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
297	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
237	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
502	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
344	0	0	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
121	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
510	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
511	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
995	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
376	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
290	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
506	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
424	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
289	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
406	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
384	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1TM2 1TM6 TM11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2H20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
1MA12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
462	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla R79. (Continuación).

N°	AFRC	AFRS	AFRE	AFRO	ALB	AND	BEL	CAT	DEN	DRUZ	EST	FIN	GEO	GB	GRE	SIC	ITSU	NOR	JOR	POR	RKAR	RNC	SAA	SIR	SUIZ	TUR	NIL	NEOL	PAL	NEPI	NEPO	
101	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	3	2	1	0	1	
309	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
119	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
519	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
378	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
516	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
336	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
390	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
326	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
332	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
345	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
200	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
415	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	
515	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
152	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
1029	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	
799	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
304	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
208	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	
268	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	2	1	0	0	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	
136	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	3	0	1	0	0	0	1	2	2	0	3	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
18	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
29	0	0	0	3	1	0	0	0	2	0	0	5	0	1	0	0	0	5	0	1	1	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
H12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
DJI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
155	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
234	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla R79. (Continuación).

N°	AFRC	AFRS	AFRE	AFRO	ALB	AND	BEL	CAT	DEN	DRUZ	EST	FIN	GEO	GB	GRE	SIC	ITSU	NOR	JOR	POR	RKAR	RNC	SAA	SIR	SUIZ	TUR	NIL	NEOL	PAL	NEPI	NEPO		
269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
566	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2	3	0	0	2	0	0	0	0		
852	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
745	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
453	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
467	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	4	0	0	1	3	1	0	0	0	1	0	1	0	0		
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1MA5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
123	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	1	0	0	0	0	0	0		
457	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
456	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
739	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
273	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
79	0	0	0	3	2	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
481	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
192	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
841	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
120	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
193	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	3	0	0	0	5	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
265	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
262	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
365	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	4	2	2	0	3	0	2	0	0	1	2	0	30	0	2	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
771	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
215	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
591	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla R79. (Continuación).

N°	NEPO	NEPI	PAL	NEOL	NIL	TUR	SUIZ	SIR	SAA	RNC	RKAR	POR	JOR	NOR	ITSU	SIC	GRE	GB	GEO	FIN	EST	DRUZ	DEN	CAT	BEL	AND	ALB	AFRO	AFRE	AFRS	AFRC
571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
572	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
539	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1004	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
337	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	
445	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	
912	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	
261	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
538	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1MA1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TR14	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3NE	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1PI	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

El árbol filogenético de Neighbor-Joining distingue la mayor parte de haplogrupos europeos y africanos, aunque algunos haplotipos no se clasifican correctamente, en particular los que presentan sustituciones homoplásicas, es decir, que se han producido de forma paralela en dos líneas independientes.

Los **haplogrupos** mitocondriales hermanos **J** y **T** aparecen bien separados del conjunto restante y unidos entre sí mediante un nexo que los conecta por la base. En el haplogrupo T, el subgrupo T2 –en el que se incluyen dos muestras antiguas: H12 y DJ1–, ocupa una posición separada del conjunto restante. El haplogrupo J incluye, en este caso, tres secuencias antiguas de diferente procedencia cronológica y geográfica (1TM5, 2NE y AB9) con el mismo haplotipo. Las líneas 197 y 218 –también pertenecientes a este haplogrupo– se separan del clado aunque están cercanas a su base.

El **haplogrupo V** –con tres haplotipos diferentes– se distingue también, aunque incorpora la línea 1004, la cual no pudo ser asignada a ningún haplogrupo actual. Su grupo “predecesor” **pre-HV** –representado aquí por un solo haplotipo– se agrupa junto con las líneas 204, 48 y 446, pertenecientes al haplogrupo H, y con el haplotipo nº 14, que pudiera ser también pre-HV.

El **haplogrupo U** es muy heterogéneo y, de acuerdo con la caracterización basada en enzimas de restricción, contiene los subgrupos U1, U2, U3, U4, U5, U6 y K. La mayor parte de estos haplotipos pueden ser distinguidos por la información de la Región Hipervariable I, pues presentan sustituciones diagnósticas bien definidas. Sin embargo, hay haplotipos de HVSI, comunes a los haplogrupos H y U, que no pueden asignarse con seguridad a ninguno de ellos con tan sólo esta información. Es el caso de la secuencia más común en Europa, la secuencia consenso o CRS (ANDERSON *et al.* 1981), que pudiera pertenecer tanto al haplogrupo H como al U (RICHARDS *et al.* 2000). El árbol Neighbor-Joining distingue aquellos subgrupos del haplogrupo U más frecuentes en la muestra estudiada, como es el caso de U5, U4 y K. Así, el **grupo U5** – en el que no se incluye ninguna muestra antigua–, se separa bien del resto, y se aprecian en su interior los subgrupo U5a1 y U5b. Al **grupo U4** lo conforman cinco haplotipos, dos de los cuales corresponden a las muestras antiguas del yacimiento de Mari 2MA2 y 1MA5. El **grupo K** forma, asimismo, un clado que incorpora tres muestras antiguas del mismo yacimiento: TR12, TR16 y TR18. El haplotipo 190 –compartido también por las

muestras 2TM4, 1H17 y TH2-, presenta una de las dos sustituciones que definen el haplogrupo K, la transición 16224C. Esta línea ha sido descrita dentro de los haplogrupos H y K, aunque la sola información de la Región Hipervariable I no permite una asignación precisa. El **grupo U3** incluye en este caso tres haplotipos que se agrupan en un mismo clado; sin embargo no puede hablarse de un grupo monofilético, pues incorpora además otros dos haplotipos, el n° 564 y el correspondiente a la muestra antigua 3NE, variantes ambas que no pudieron ser asignadas previamente a ningún haplogrupo. Los **subgrupos U1** y **U6** están representados, cada uno, por un único haplotipo, y aparecen dentro de un clado artificial, en el que se incluyen, además, haplotipos de otros haplogrupos, como el H, X, L3 y L1, así como un conjunto de líneas sin asignar. Este insólito grupo incorpora el haplotipo de la muestra antigua 1PI. En el árbol Neighbor-Joining, el cluster U no aparece como monofilético, pues los 7 subgrupos mencionados se reparten en tres clados diferentes. Así, los haplotipos del subcluster U5, U3 y K aparecen dentro de un clado polifilético que incorpora haplotipos del haplogrupo H y otras líneas desconocidas. El subcluster U4 aparece en una rama separada del grupo anterior, y los dos linajes representantes de los haplogrupos U1 y U6 están incluidas en el anteriormente citado “clado artificial”.

El **haplogrupo W** aparece también diferenciado y próximo al haplogrupo U4. Los haplogrupos N1b, R1 o I son minoritarios en la muestra estudiada y cada uno de ellos está representado por un único haplotipo. En la presente reconstrucción filogenética dichos haplotipos se sitúan en el interior de ciertos haplogrupos africanos como el L2 o el L3.

Buena parte de los haplotipos africanos quedan correctamente clasificados en haplogrupos. Así sucede con los subclusters L1a, L1b, L1c y L1d del haplogrupo L1, con el cluster M1, y con la mayor parte de los haplotipos del grupo L2. Las subvariantes del haplogrupo L3, L3a y L3b, aparecen mezcladas entre sí y relacionadas con los haplogrupos asiáticos y americanos nativos C y D, el primero de los cuales incluye la secuencia del individuo TR19. Otro haplogrupo asiático-americano, el **haplogrupo X**, no queda bien resuelto y sus haplotipos aparecen, por una parte, relacionados con los haplotipos africanos del grupo L2 y, por otra, dentro del clado polifilético que incluye a la secuencia antigua 1PI.

Como otros autores han observado con anterioridad (RICHARDS *et al.* 1996), el algoritmo utilizado en la reconstrucción filogenética de Neighbor-Joining separa eficientemente la muestra de haplotipos en los haplogrupos europeos J, T, K y U5. En cambio, tiende a agrupar variantes de diferente origen en un mismo grupo, como sucede aquí con el grupo que incluye a la secuencia de 1PI, e igualmente tiende a separar haplotipos con un origen común. Según se ha comentado, la causa principal es la presencia de sustituciones homoplásicas que han surgido de forma paralela en dos líneas independientes. Este fenómeno es especialmente frecuente en marcadores con una tasa de mutación elevada, como ocurre con los microsatélites y con la región control del DNA mitocondrial. En el caso del mtDNA, los fenómenos de homoplasia y reversión afectan preferentemente a ciertas posiciones con una tasa de mutación mayor a la media, posiciones denominadas “puntos calientes de mutación” o “*hot spots* mutacionales”. Una forma de afrontar este fenómeno es representar los datos en forma de “networks” o redes que contemplan múltiples posibilidades como se verá después. Por otra parte, la sola información de la Región Hipervariable I del DNA mitocondrial es insuficiente para una correcta agrupación de los haplotipos en haplogrupos monofiléticos, siendo recomendable, en ciertos casos, la caracterización de otras regiones de la misma molécula.

En lo tocante a la topología del árbol, los haplotipos africanos y asiático-americanos se distinguen del conjunto restante y se agrupan básicamente en tres ramas, de las cuales la más larga está formada por representantes del haplogrupo africano L1. La segunda la integran haplotipos de los haplogrupos L3 y C. La tercera está constituida básicamente por miembros del haplogrupo L2. Las ramas restantes identifican, con mayor o menor precisión, los principales haplogrupos europeos.

La distribución de las muestras antiguas en el entramado de haplotipos actuales representado denota, a primera vista, una gran diversidad. Entre los haplotipos más divergentes del conjunto, identificados con el haplogrupo africano L1b, se encuentran dos secuencias de época neolítica del yacimiento de Nerja (Málaga). En un extremo del grupo L2 se hallan otras cinco muestras de tres yacimientos diferentes, tres de las cuales, provenientes del yacimiento calcolítico de Tres Montes (Navarra), comparten el mismo haplotipo. Relacionados con ellas se encuentran los haplotipos de las muestras 1MA12 y 2H20 de los yacimientos sirios de Mari (~4500 A.P.) y Tell Halula (10000

A.P.). Completan la representación del acervo africano otras tres muestras de Mari (2MA10), Tell Halula (1H15) y Toledo (TO1) que se incluyen, junto con otros haplotipos, en el haplogrupo L3. Una bifurcación del clado al que pertenecen estas secuencias conduce a la secuencia de TR19, la cual se agrupa con otros dos haplotipos del haplogrupo asiático C. Algunas de las restantes secuencias antiguas aparecen en clados formados por haplotipos del mismo haplogrupo. Esto sucede con las muestras 2MA2 y 1MA5, presentes dentro del cluster U4; TR16, TR18 y TR12 dentro del K; 3MA11, 1TM5, 2NE y AB9 en el J; y DJ1 y H12 en su grupo hermano T. La muestra 1PI aparece relacionada con secuencias de las poblaciones Saami (haplotipo 912), Drusa (haplotipos 571-X y 566-U1) y de Austria, Francia, Finlandia y Karelia de Rusia (haplotipo 35), todas ellas en un clado polifilético del que ya se ha hecho mención. Las muestras 1MA1 y AB17 se ubican dentro de un grupo que contiene secuencias de los haplogrupos H (451), L3a (516) y U3. Los haplotipos representados en este grupo están hoy presentes en poblaciones del Noreste y Sureste de Europa: Finlandia, Noruega, Italia del Sur y Sicilia, además de en la población de África del Sur. La muestra paleolítica del yacimiento de Nerja 3NE se agrupa con tres secuencias del haplogrupo U3 (745, 88 y 852) y con una a la que no se pudo asignar haplogrupo (haplotipo 453). Tales variantes se distribuyen hoy en varias poblaciones de Próximo Oriente como Turquía, Siria e Israel (Drusos) y en poblaciones próximas como Bulgaria, Norte del Cáucaso y Valle del Nilo, aunque aparecen también en Portugal, Sicilia y Noruega. Las muestras TH5, TH2, 1H17, 2TM4 y TR14 se sitúan dentro del clado heterogéneo que incluye varios subgrupos del haplogrupo U, próximas al grupo formado por el sub-haplogrupo K. Como se ha comentado anteriormente, la sola información aportada por la Región Hipervariable I resulta aquí insuficiente para clasificar adecuadamente estas secuencias. Las muestras TR8 y 1H14 aparecen dentro del entramado formado por los derivados directos del haplotipo consenso (CRS), en el que se incluyen por otra parte 2PI y AB5. La ausencia de correspondencia entre los haplotipos de TR8 y 1H14 y el conjunto de secuencias actuales justifica su no inclusión *a priori* dentro del haplogrupo H.

En la **Figura FR69** se muestra el árbol filogenético reconstruido con el método UPGMA a partir de la matriz de distancias Tamura-Nei con parámetro $\gamma=0,47$ entre los mismos haplotipos. Para el enraizamiento del árbol se emplearon como *outgroups* dos secuencias de Neandertal (KRINGS *et al.* 1997; OVCHINNIKOV *et al.* 2000).

Después de las dos secuencias de Neandertal, las ramas más divergentes corresponden a los haplotipos de África Central, África del Este y Valle del Nilo pertenecientes a los haplogrupos L1c y L1a. A continuación los haplogrupos L1b, M1, L1d y L2, que mediante este método de reconstrucción filogenética quedan también correctamente agrupados. Entre estas ramas más profundas se encuentran algunas muestras antiguas, como las neolíticas de Nerja 4NE y 5NE, agrupadas dentro del haplogrupo L1b, tal como sucedía en el árbol Neighbor-Joining (**Figura FR68**). Le siguen, dentro del clado L2, las secuencias de 1MA12, 2H20, TM11, TM6 y 1TM2. Una dicotomía que parte de la base del clado L2 agrupa el conjunto de haplotipos restantes. Algunos de tales haplotipos forman clados monofiléticos, como sucede con aquellos pertenecientes a los haplogrupos K, V y W. Otros muchos, como el J, L3a y b o U aparecen en grupos parafiléticos, es decir, que incluyen ciertos haplotipos con un origen común excluyendo otros. Dentro del haplogrupo U, los sub-clusters U5, U3 y U4 forman parte también de grupos parafiléticos, que, en algunos casos como el U4, son también polifiléticos pues incorporan secuencias de otros haplogrupos. Tampoco se refleja aquí la relación entre los diferentes sub-haplogrupos, que sí era apreciable en el árbol Neighbor-Joining.

La muestra 3MA11 se agrupa con tres haplotipos del haplogrupo J. Las tres muestras antiguas 1TM5, AB9 y 2NE –clasificadas también como J– aparecen en el otro extremo del árbol, asociadas a otros haplotipos de otros haplogrupos, entre los que se incluye la muestra TH5. Tras dos bifurcaciones del clado de 3MA11 se encuentra la muestra TR19 en un grupo que incluye dos linajes del haplogrupo C y una secuencia del L3b. Las secuencias de DJ1 y H12 aparecen juntas y asociadas al haplogrupo T, tal como sucedía en el árbol Neighbor-Joining. En este caso, sin embargo, las dos muestras antiguas se relacionan directamente con la secuencia 462 del haplogrupo L3. La muestra 1PI está incluida en un clado polifilético, que –como en el árbol Neighbor-Joining–, incorpora haplotipos de los haplogrupos U1, U6 y X. Los individuos 2MA10, TO1 y 1H15 se agrupan, aquí también, con otras líneas del haplogrupo L3. Sin embargo,

mientras que en el árbol de Neighbor-Joining ocupaban una posición próxima a las líneas africanas más divergentes, aquí se mezclan con el conjunto europeo. Como hemos mencionado, el haplogrupo K constituye –también en este árbol– un clado monofilético que contiene las secuencias de TR16, TR18 y TR12 y en el que aparecen de nuevo vinculadas las muestras TR14, TH2, 2TM4, 1H17. Los individuos del yacimiento de Mari 1MA5 y 1MA2 se sitúan con los haplotipos 467 y 24 del haplogrupo U4 y 448 del haplogrupo H respectivamente. Los individuos restantes se distribuyen en las ramas menos profundas del árbol, siendo el último el haplotipo consenso (*CRS*), representado en AB5 y 2PI.



Figura FR69. Árbol filogenético de UPGMA construido a partir de la matriz de distancias de Tamura-Nei con parámetro $\gamma=0,47$ para los haplotipos de población actual de frecuencia absoluta superior a 2 y con las 35 secuencias antiguas obtenidas. Dos secuencias de Neandertal –NEAND1 y NEAND2– (KRINGS *et al.* 1997; OVCHINNIKOV *et al.* 2000) han sido incluidas a manera de *outgroup*.

6.3.3.1.2. Median Joining Networks

Se construyeron dos árboles filogenéticos mediante el algoritmo de Median Joining Network con la mayor parte de los haplotipos de población actual de frecuencia mayor a dos y con todos los recuperados de las muestras antiguas. La primera de estas reconstrucciones (**Figura FR70**) muestra la diversidad europea mientras que en la segunda (**FR71**) se representan aquellos haplotipos pertenecientes a haplogrupos africanos y asiático-americanos.

El primero de los Median Joining Networks (**Figura FR70**) presenta una topología muy similar a la reproducida en otros trabajos a partir de la información de la región Hipervariable I del mtDNA (RICHARDS *et al.* 1996, 1998), en la que el haplotipo más abundante –la secuencia consenso o *CRS*– ocupa la posición central de la red y de él parten nuevas variantes de las que surgen, a su vez, otros haplogrupos. Los haplogrupos J, T, K, V, U4 U5 y U4 arrancan directamente de la secuencia consenso y se encuentran claramente separados y diferenciados. Del haplotipo 101 –caracterizado por la transición 16223C– surgen, asimismo, los haplogrupos I/G, W y N1b. Por su parte, el haplogrupo X –presente en Europa, Asia y en algunas poblaciones americanas nativas del norte– procede del haplotipo 31, definido por el cambio 16189C. La ausencia de información de la posición 00073 de la región Hipervariable II provoca que los haplogrupos hermanos H y V no queden separados del resto. Por lo general, los haplogrupos muestran el característico patrón en forma de estrella resultante de las expansiones poblacionales. En los haplogrupos J, T, U5 y probablemente también K, las secuencias derivadas presentan ramas largas, mientras que en el haplogrupo H los derivados presentan ramas cortas. El resto de haplogrupos está representado por un número de haplotipos demasiado pequeño como para realizar cualquier tipo de asunción a este respecto.

En el diagrama que venimos comentando, el *haplogrupo J* está diferenciado únicamente por una de las dos mutaciones que lo caracterizan, la transición 16126C; la posición 16069 quedaba fuera de la región secuenciada en las muestras antiguas y no fue incluida en el conjunto de muestras actuales para las reconstrucciones filogenéticas. Ello implica que parte de los individuos portadores del haplotipo 63 (16069T-16126C) podrían pertenecer al haplogrupo pre-HV en base a la información de esta posición. No

obstante, es esperable que el porcentaje sea pequeño debido a que la frecuencia del haplotipo 16126C en poblaciones actuales es muy baja (RICHARDS *et al.* 2000). Dentro del cluster J pueden diferenciarse diferentes subclusters. El subcluster J1, caracterizado por las sustituciones 16126C y 16261T (haplotipo 52), se subdivide en dos: el J1a (haplotipo 40) y el J1b (haplotipo 537), dentro del cual se distingue el subgrupo J1b1 (haplotipo 657). En la presente reconstrucción, el nodo situado en la raíz de los subclusters J1a y J1b –caracterizado por las sustituciones 16126C, 16145A y 16261T–, se encuentra vacío y representado por un *median vector* (mv3). Aunque este haplotipo no fue empleado para la presente reconstrucción –por presentar una frecuencia absoluta inferior a 2– está presente, no obstante, en la base de datos de secuencias actuales en dos individuos de Próximo Oriente y en un individuo del Cáucaso. En el árbol Median Joining la secuencia correspondiente a la muestra 3MA11 del yacimiento de Mari (16126C-16145A-16231C-16356C) aparece dentro del haplogrupo J –más concretamente en el subcluster J1a–, tal como sucedía en el árbol de Neighbor-Joining (**Figura FR68**). De acuerdo con el Median Joining Network, este haplotipo habría surgido del haplotipo 40 (16126C-16145A-16231C-16261T) –mediante la pérdida del cambio 16261T– por retromutación y posterior adquisición de la transición 16356C. Sin embargo el haplotipo 16126C-16145A-16231C –que cabría suponer como antecesor directo de la secuencia de 3MA11– no está representado en la base de datos de secuencias actuales. La ruta alternativa sería la adquisición primera de la mutación 16356C seguida por la pérdida del cambio 16261T, aunque el haplotipo antecesor –en este caso 16126C-16145A-16231C-16261T-16356C–, carece, también, de representación en la base de datos. La ausencia de estas variantes en la compilación de secuencias actuales creada para la presente tesis doctoral no descarta su ausencia en algún lugar actualmente. También podría tratarse de haplotipos que hayan desaparecido por fenómenos de deriva genética. De las dos posibilidades planteadas y en base a la información extraída de la base de datos de secuencias actuales, la segunda de ellas parece la más parsimoniosa teniendo en cuenta que los haplotipos que contienen la mutaciones 16126C-16145A van acompañados, además, del cambio 16261C. Consiguientemente, cabría esperar que esta posición hubiera retromutado sólo una vez a partir de una secuencia derivada.

En el mismo haplogrupo J se incluyen otras tres secuencias antiguas procedentes de respectivos yacimientos de la Península Ibérica de diferente datación y localización

geográfica. Este es el caso del individuo 2NE del estrato solutrense de la Cueva de Nerja (Málaga) y de dos individuos calcolíticos de los yacimientos navarros de Abauntz (AB9) y Tres Montes (1TM5). Los tres exhiben el haplotipo 16126C-16311C presente, también, en cuatro individuos de la muestra actual (haplotipo 247), tres de los cuales proceden de Próximo Oriente –Siria, Kurdistan e Israel (Drusos)– y uno de África del Oeste.

En la presente reconstrucción el *haplogrupo T* queda bien diferenciado de su haplogrupo hermano J por la transición 16294T. Sin embargo, –y como varios estudios de genética de poblaciones actuales han puesto de manifiesto–, los nodos del subgrupo T*: 16126C-16294T; 16126C-16294T-16296T; 16126C-16294T-16296T-16304C y 16126C-16294T-16296T-16304C, representados aquí respectivamente por los haplotipos 136, 46, 29 y 18 forman un círculo que no ha podido resolverse mediante la caracterización de otras regiones del mtDNA (RICHARDS *et al.* 1998, 2000). Para la resolución del mismo en la presente reconstrucción filogenética se empleó la misma estrategia que en RICHARDS *et al.* 2000. Consiste en asignar peso 0 a la posición 16296, asumiendo que se trata de un lugar altamente inestable que ha mutado por lo menos 10 veces dentro del subcluster T*. Este ajuste provoca que el haplotipo 46 (16126C-16294T-16296T) quede incluido en el nodo 136 (16126C-16294T), el haplotipo 29 (16126C-16294T-16296T-16304C) en el 18 (16126C-16294T-16304C), el haplotipo 85 (16126C-16292T-16294T-16296T) en el 155 (16126C-16292T-16294T) y el haplotipo 269 (16126C-16153A-16294T-16296T) en el 19 (16126C-16153A-16294T).

Igual que sucede con el haplogrupo J, el haplogrupo T presenta una extensa subestructura que queda, también, patente en la **Figura FR70**. En este cluster se distinguen los subclusters T1 (haplotipo 25), T2 (haplotipos 18 y 29), T3 (haplotipos 85 y 155), T4 (haplotipo 234) y T5 (haplotipos 19 y 269). Las muestras H12 y DJ1 –que en el árbol de Neighbor-Joining aparecían vinculadas a este haplogrupo– aparecen aquí como derivadas del haplotipo 16304C, presente en un individuo neolítico de Próximo Oriente (1H14) y en 31 individuos de la base de datos de población actual (haplotipo 148). Dos muestras antiguas exhiben las mutaciones 16294T y 16304C características del subcluster T2, pero no la transición 16126C que distingue a los clusters J y T, por lo

que podría tratarse de dos haplotipos del haplogrupo T2 en los que la posición 16126C ha retromutado.

El individuo H12 exhibe el haplotipo 16266T-16294T-16304C, que de ser cierta esta última posibilidad, procedería del nodo 16126C-16266T-16294T-16304C. Este haplotipo no está presente en la base de datos de secuencias actuales construida para la presente tesis doctoral, pero sí aparece en tres individuos de Escandinavia, Mediterráneo Oeste y Mediterráneo Centro en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000. Por otra parte la secuencia de H12 podría ser resultado de la adquisición de la mutación 16266T por el haplotipo 16294T-16304C representado en el Median Joining Network por un *median vector* (mv4). Este nodo tampoco está presente en la base de datos de población actual, pero, de nuevo, sí aparece en la de RICHARDS *et al.* 2000 en tres individuos del Noreste, Sureste y del Norte-Centro de Europa. Ambas posibilidades resultan aquí igualmente parsimoniosas y dificultan la asignación de haplogrupo a esta secuencia.

La segunda de las posibilidades planteadas arriba resulta, en cambio, más plausible a la hora de explicar el origen del haplotipo 16218T-16294C-16304C-16320T del individuo DJ1 pues la secuencia 16126C-16218T-16294C-16304C-16320T no aparece ni en la base de datos endógena ni en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000. Sin embargo el haplotipo 16294T-16304C-16320T está representado en ambas, en dos individuos de Alemania y Gran Bretaña en la primera y en uno del Noroeste de Europa en la segunda. Sea como sea, la “ausencia de evidencia”, en este caso de haplotipos predecesores, no debe ser tomada como “evidencia de la ausencia”, pues –como se ha apuntado anteriormente–, la composición genética de las poblaciones del pasado todavía es desconocida. Sería posible, por lo tanto, que aquellos eslabones que hoy encontramos vacíos estuvieran, en un pasado, representados por secuencias “reales” que se hubieran extinguido por fenómenos de selección o deriva. Esta y otras cuestiones relativas al origen, frecuencia y distribución de los haplogrupos mitocondriales se tratarán con mayor profundidad en el apartado “Discusión” de la presente tesis doctoral.

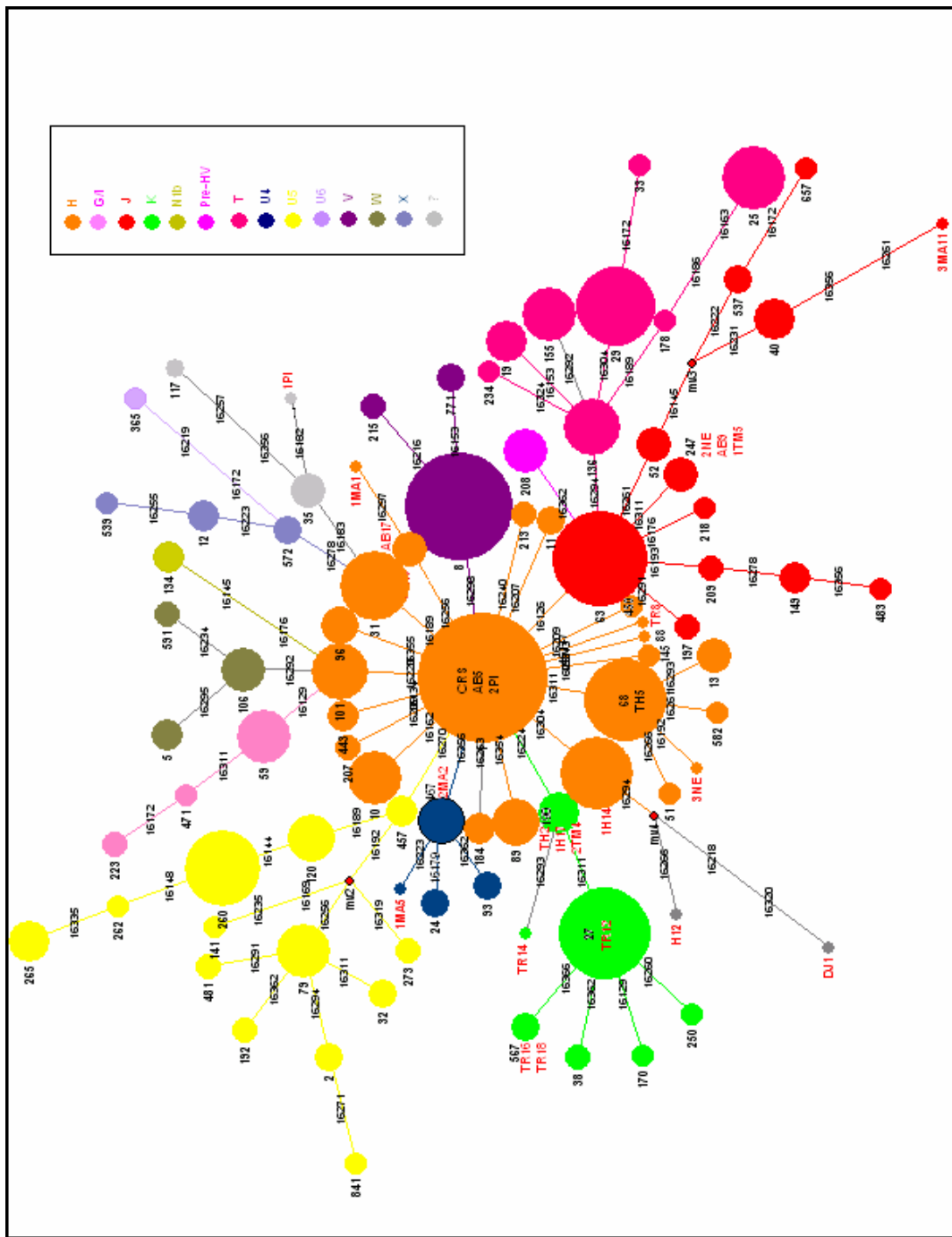


Figura FR70. Reconstrucción filogenética de Median Joining Network que incluye algunos haplotipos de población actual de frecuencia mayor a dos y todos los haplotipos recuperados de las muestras antiguas pertenecientes a haplogrupos europeos.

El haplogrupo U –definido por el polimorfismo de restricción +12308*HinfI*– engloba a los subclusters U1, U2, U3, U4, U5, U6, U7 y K. Si bien estos últimos pueden distinguirse correctamente a partir de la información de la HVRI, ésta no permite discernir entre ciertos haplotipos, como la secuencia consenso o *CRS*, que pueden pertenecer tanto al haplogrupo U como al H.

En el Median Joining Network aparecen representados 4 de estos 8 subclusters: U4, U5, U6 y K. Aunque presente en la relación de haplotipos de frecuencia mayor a dos (**Tabla R79**), el *subhaplogrupo U3* no fue incluido en esta reconstrucción filogenética pues complicaba las relaciones entre haplotipos de otros haplogrupos. Además, este subcluster está representado únicamente por tres haplotipos entre los que no se incluye ninguna muestra antigua.

El *subhaplogrupo U5* tampoco incluye a ninguna muestra antigua, pero, debido a su gran sub-estructuración, se consideró interesante incluirlo en la representación filogenética. Para ello fue necesaria la eliminación de ciertos haplotipos a fin de reproducir una relación entre sus diferentes subgrupos acorde a la obtenida por otros investigadores a partir de un conjunto mucho más amplio de secuencias actuales de Europa y Próximo Oriente (RICHARDS *et al.* 1998, 2000). La posición 16192T es inestable y ha mutado varias veces dentro del subhaplogrupo U5 (MACAULAY *et al.* 1999a; FINNILÄ *et al.* 2000), lo que provoca la aparición de reticulaciones con las posiciones 16270T, 16189C, 16256T y 16311C. Para resolver estas ambigüedades fueron eliminados de la reconstrucción filogenética los haplotipos 123 (16256T-16270T), 456 (16256T-16270T-16311C), 739 (16270T-16311C) y 193 (16189C-16192T-16270T). Ello permite distinguir –en el subcluster U5– los grupos U5b (haplotipo 120) y U5a (haplotipos 273 y 141) en base a las posiciones 16192T y 16189C respectivamente. Dentro de U5a los haplotipos 79, 32, 2, 841, 192 y 481 se asignaron al grupo U5a1 de acuerdo con la posición 16256T. De la misma manera, el subcluster U5b contiene el grupo U5b1, caracterizado por la transición 16144C y representado por los haplotipos 260, 262 y 265.

El *subhaplogrupo U6* –representado en la **Figura FR70** y en la **Tabla R79** por un único haplotipo (65)–, aparece aquí relacionado con secuencias del haplogrupo X, con las que comparte los cambios 16189C y 16278T. Esta relación es equívoca –tal

como se ha demostrado en reconstrucciones filogenéticas a partir de un número más amplio de secuencias de este subcluster (RICHARDS *et al.* 1998, 2000; MACAULAY *et al.* 1999a)–, y es debida a la presencia de un solo representante de este haplogrupo.

El diagrama incluye, también, a cinco miembros del **subhaplogrupo U4** entre los que se encuentran dos muestras antiguas del yacimiento sirio de Mari, los individuos 2MA2 y 1MA5. El primero de ellos, caracterizado por el cambio 16356C (haplotipo 467), se sitúa en la base de este haplogrupo, mientras que el segundo ocupa un nodo que surge directamente de éste (16223C-16356C). Aunque este último haplotipo no está representado en nuestra base de datos de secuencias actuales, sí aparece sin embargo en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000 en un individuo de Turquía y dos individuos del Noreste de Europa. De hecho, la distribución de todas las variantes aquí representadas aparece confinada a las regiones de Próximo Oriente-Norte del Cáucaso y al Noreste de Europa.

En la **Figura FR65**, el **subhaplogrupo K** exhibe una marcada topología en estrella similar a la observada en otros estudios (RICHARDS *et al.* 1998, 2000). Tres muestras del yacimiento neolítico de Tell Ramad pertenecen a este subcluster. Una de ellas, la muestra TR12, exhibe el haplotipo fundador (16224C-16311C), representado en la muestra de población actual por 50 individuos de la mayor parte de poblaciones de Europa y Próximo Oriente. Los otros dos individuos antiguos: TR16 y TR18, presentan un haplotipo derivado del fundador (16224C-16311C-16366T) que comparten con tres individuos de la actual comunidad Drusa de Israel (haplotipo 567). El haplotipo 190 (16224C) –presente en TH2, 1H17 y 2TM4–, puede incluir miembros de los haplogrupos H y K, que, para su correcta asignación, necesitarían de información adicional de la HVRII (posición 00073A o G) y de los polimorfismos de restricción +11718HaeIII, -14766MseI y 7025AluI para el haplogrupo H, y +12308HinfI para el K. Según el diagrama de Median Joining, el haplotipo del individuo TR14 (16224C-16293C) deriva del haplotipo 16224C, mediante adquisición de la mutación 16293C. Este parece el camino más probable teniendo en cuenta la elevada frecuencia del haplotipo original. La otra posibilidad –su evolución a partir del haplotipo 16224C-16293C-16311C tras la reversión del cambio 16311C–, resulta menos probable ya que este potencial nodo ancestral no se encuentra representado en ningún individuo de la base de datos ni tampoco en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000.

En el diagrama aparecen también representados los **haplogrupos G/I, N1b, W y X**. Estos haplogrupos son minoritarios en Europa y su frecuencia en la totalidad de la base de datos no supera el 6%. Todos se caracterizan por presentar el polimorfismo ancestral 16223T –representado aquí por el haplotipo nº 96–, que incluye principalmente miembros del haplogrupo africano L3 y –como veremos en la representación de los haplogrupos africanos–, algunas secuencias antiguas. En la **Figura FR70** los haplogrupos G/I, W y N1b radian a partir de esta secuencia ancestral, pero no sucede así con el haplogrupo X, que procede del haplotipo 31 (16189C). Aunque tanto la posición 16223 como la 16189 han sido definidas como hipermutables (MALYARCHUK *et al.* 2002; MEYER *et al.* 1999; BANDELT *et al.* 2002), las reconstrucciones filogenéticas realizadas a partir de un amplio número de secuencias europeas y de Próximo Oriente señalan como origen más probable el nodo 16223T, con adquisición posterior de mutaciones en 16189 y 16278 (RICHARDS *et al.* 1998, 2000). A partir de la información de la región Hipervariable I resulta imposible distinguir aquellas secuencias pertenecientes a los haplogrupos G e I, puesto que ambos están definidos por las transiciones 16129A y 16223T. En la **Figura FR70** los tres únicos haplotipos representantes de estos dos haplogrupos ocupan una rama que surge del nodo 16223T.

En la figura que venimos comentando el **haplogrupo V** –constituido por tres haplotipos–, está perfectamente diferenciado. Su nodo originario –representado por el haplotipo 8 (16298C)– aparece, después de la secuencia consenso (CRS), como el más frecuente en nuestra base de datos de secuencias actuales. La caracterización de este haplogrupo mediante enzimas de restricción ha puesto de manifiesto su proximidad filogenética con el haplogrupo H, con el que comparte los polimorfismos 00073A, +11718HaeIII y –14766MseI (LAMMINEN *et al.* 1997; TORRONI *et al.* 1998b). TORRONI *et al.* 2001 distinguen entre haplogrupo V y un haplogrupo más amplio que lo incluye, el denominado haplogrupo pre-V, aunque con la sola información de la región hipervariable I ambos resultan indistinguibles. De acuerdo con estos autores la distribución de los miembros del haplogrupo V, propiamente dicho, muestra una clina oeste-este con frecuencia máxima en el noreste de la Península Ibérica. Esta distribución, junto con las estimas de datación basadas en la diversidad del haplogrupo, sitúan su origen hace aproximadamente 16300 ± 4800 años en el noreste de la Península Ibérica con subsecuente expansión hacia el este y el centro de Europa. Sin embargo, y

como se discutirá posteriormente, ninguna de las muestras antiguas analizadas pertenecen a este haplogrupo.

En el presente diagrama se distingue también el *haplogrupo pre-HV*, representado por una única secuencia (haplotipo 208), que emerge directamente del nodo 16126C (haplotipo 63). Estrictamente, este motivo constituye un sub-clado del haplogrupo pre-HV (RICHARDS *et al.* 2000), el cual no presenta ninguna sustitución característica en la Región Hipervariable I.

El *haplogrupo H* –el más frecuente y ampliamente distribuido en las poblaciones actuales–, incluye la secuencia consenso (*CRS*) y varias secuencias derivadas, conectadas a la misma mayoritariamente por una única mutación. Debido a la escasa resolución de la región analizada, virtualmente este haplogrupo podría contener miembros de otros haplogrupos como el R, U, pre-HV o HV. A este cluster pertenecen, al menos, siete secuencias antiguas, dos de las cuales únicamente –las correspondientes a los individuos AB5 y 2PI–, coinciden con la secuencia consenso. El individuo AB17 del yacimiento calcolítico navarro de la Cueva de Abauntz tiene la sustitución 16256T, presente en otros siete individuos actuales de África del Oeste actuales y en Finlandia, Sicilia, Italia del Sur y Noruega. Como derivado de este nodo aparece el haplotipo de la muestra del yacimiento de Mari 1MA1, único entre el conjunto de secuencias representadas. Otro haplotipo único derivado de la secuencia consenso corresponde al individuo TR8 –del yacimiento neolítico sirio de Tell Ramad– que se caracteriza por la transversión 16147A. Como ya se ha comentado, el individuo 1H14 presenta el motivo 16304C (haplotipo 148), presente hoy en elevada frecuencia en Europa y Próximo Oriente. Según RICHARDS *et al.* 1998, este motivo constituye un subcluster dentro del haplogrupo H que sufrió una expansión paralela a la de otros miembros de dicho haplogrupo. Entre otros de los subclusters de H definidos por este autor se encuentra el caracterizado por la transición 16311C, representado aquí por 41 individuos procedentes, la mayoría, de poblaciones actuales europeas y de Próximo Oriente (haplotipo 68) así como por una muestra antigua (TH5). Este subcluster presenta varios derivados (haplotipos 51, 582 y 13) entre los que se encuentra una muestra antigua, 3NE.

Finalmente, cinco haplotipos de los cuales tres corresponden a otras tantas muestras antiguas (1PI, H12 y DJ1) no pudieron asignarse a ningún haplogrupo mitocondrial con la información disponible. El origen filogenético de los individuos H12 y DJ1 ya fue discutido anteriormente, sin embargo la situación de la muestra 1PI, relacionada con los otros dos haplotipos sin asignar, merece una atención especial. La particularidad del haplotipo de esta muestra radica, por una parte, en la presencia de dos transversiones del tipo A→C, cambio situado entre los menos frecuentes en secuencias actuales (MALYARCHUCK *et al.* 2002). Por otra parte, el sólo cambio de T→C en la posición 16189 genera un tracto de 10 policitosinas entre las posiciones 16184 y 16193 que es altamente inestable. La elevada inestabilidad de este tracto se manifiesta en la aparición de diferentes variantes de longitud en los individuos portadores de la sustitución 16189C e incluso dentro de un mismo individuo (HOWELL y SMEJKAL 2000). El tracto se convierte en uno de 12 policitosinas al mutar también las posiciones 16182 y 16183, lo que aumenta la inestabilidad. El orden de mutaciones propuesto en la presente reconstrucción implica la adquisición primera de la transición 16189T→C (haplotipo 31) seguida por la transversión 16183A→C (haplotipo 35) y finalmente por el cambio 16182A→C (haplotipo 1PI). En la presente base de datos, el motivo 16183C-16189C aparece sólo en poblaciones del norte de Europa como Austria, Francia, Finlandia y Karelios de Rusia. Aunque no están representados en el Median Joining Network debido a su baja frecuencia, este nodo presenta varios derivados directos. Sin embargo no existen representantes del motivo 16189C-16182C, lo que corrobora el orden mutacional propuesto. El haplotipo de la muestra 1PI no aparece ni en la relación de haplotipos de nuestra base de datos ni en la de RICHARDS *et al.* 2000, y únicamente se ha detectado un derivado directo presente en un individuo kurdo en la primera de ellas (haplotipo 16182C-16183C-16189C-16249C). Como comentaremos en el siguiente apartado, la información disponible apunta a que la combinación 16182C-16183C-16189C es poco frecuente en las poblaciones actuales. En nuestra base de datos aparece únicamente en seis haplotipos, uno de los cuales, el haplotipo 912 (126C-136C-182C-183C-189C-223T-360T-362C) aparecía relacionado con 1PI en el árbol de Neighbor-Joining (**Figura FR68**). Este haplotipo, no incluido en el diagrama de Median Joining Network, está presente únicamente en la población Saami. Los cinco haplotipos restantes aparecen en baja frecuencia en poblaciones africanas o con componente africano como Sicilia y en el individuo kurdo anteriormente citado.

En la **Figura FR71** se representa el diagrama de Median Joining Network construido con los haplotipos pertenecientes a haplogrupos africanos y asiático-americanos. Como puede apreciarse a simple vista, la topología de la reconstrucción difiere notablemente de la obtenida para los haplotipos europeos y de Próximo Oriente. Ello se debe, en parte, a que el tamaño de la muestra es aquí mucho más reducido, aunque esencialmente los haplotipos representados están separados por un número mucho mayor de mutaciones, lo que es causa de la extrema longitud de algunas de las ramas.

El nodo central del que radian el resto de haplotipos lo constituye aquí el motivo 16223T, representado en la base de datos de secuencias actuales por el haplotipo 101. Este haplotipo es ancestral a los clusters derivados de la secuencia consenso (JTUHV) y a otros clusters europeos (IWX) (RICHARDS *et al.* 1998). Incluso se ha sugerido que pudo ser este el haplotipo mayoritario en la expansión fuera de África (WATSON *et al.* 1997). Este nodo incluye a representantes de los haplogrupos L3 africano y de los superclusters N y M euroasiáticos (RICHARDS *et al.* 2000; WATSON *et al.* 1997; SALAS *et al.* 2002). En el presente estudio los individuos antiguos TO1, 1H15 y 2MA10 se ubican en este mismo nodo.

Los miembros del **haplogrupo L2** se separan del nodo central por la transición 16278T, lo que concuerda con el estudio reciente de SALAS *et al.* 2002. Dentro de este haplogrupo se incluyen 18 haplotipos, de los cuales 3 corresponden a muestras antiguas. Tales haplotipos ocupan el extremo final de una de las ramas de este haplogrupo. El haplotipo de 2H20 (16223T-16261T-16278T-16294T-16309G) se sitúa en la base de los otros dos haplotipos antiguos y en la presente reconstrucción procede del nodo 121 (16223T-16278T-16294T-16309G), presente en un individuo de Canarias, dos de África del Este, cuatro de África del Oeste y uno del Valle del Nilo. El motivo de 2H20 no es único en la base de datos de secuencias actuales sino que aparece también en un individuo de África del Oeste. De este nodo derivan, por una parte, el haplotipo de 1MA12 (16223T-16256T-16261T-16278T-16294T-16309G) y, por otra, el haplotipo compartido por los individuos del yacimiento de Tres Montes 1TM2, TM6 y TM11 (16261T-16278T-16294T-16309G). En este último caso se habría producido la reversión de la mutación en posición 16223, posición de elevada tasa de mutación según varios estudios (MEYER *et al.* 1999; MALYARCHUK *et al.* 2002; BANDELT *et al.*

2002). En general, la filogenia del haplogrupo L2 queda bastante bien resuelta aquí, con la única excepción del haplotipo 506 (187T-223T-278T-362C), que se sitúa fuera del clado L2 más próximo al de ciertos representantes del grupo L1.

El *haplogrupo L3* está representado por 14 haplotipos. La ausencia de información de ciertas posiciones no secuenciadas de la región Hipervariable I y de enzimas de restricción imposibilita la resolución a nivel de subclusters de este amplio haplogrupo.

Esta dificultad se hace todavía más patente en el intento de reconstrucción del *haplogrupo L1* y sus numerosas variantes. En la **Figura FR71** este haplogrupo no constituye un clado, y los representantes del subcluster L1b aparecen, por una parte, como derivados de una rama del haplogrupo L3 (haplotipo 519), mientras que las líneas de L1a, L1c, L1d y L1i proceden del nodo central del haplogrupo L2 (haplotipo 237) a través de intermediarios de los haplogrupos L3 y L2 (haplotipos 200 y 506). El efecto combinado de un reducido número de haplotipos dentro de cada subgrupo junto con la ausencia de información relativa a ciertas posiciones diagnóstico imposibilita una correcta reconstrucción filogenética entre las diferentes variantes. Sin embargo, el algoritmo consigue separar los haplotipos de cada subcluster de una forma eficaz, lo que resulta más que suficiente para el objetivo principal de la presente tesis doctoral, que no pretende más que situar las secuencias antiguas obtenidas dentro del marco de secuencias actuales. En este sentido, las secuencias de los individuos 4NE y 5NE del estrato neolítico de la Cueva de Nerja se enmarcan dentro del subhaplogrupo L1b. Respecto al resto de los haplotipos de este subcluster, ocupan una posición basal puesto que ninguno de ellos presenta las transiciones 16187T y 16189C. No obstante, reconstrucciones de este tipo realizadas con un elevado número de secuencias actuales africanas sugieren que el nodo originario del haplogrupo L1 es aquél que contiene las mutaciones 16187T-16189C-16311C. Teniendo esto último en cuenta, la única explicación para las secuencias de 4NE y 5NE es que deriven de un nodo ancestral en el que se hayan perdido las dos primeras transiciones. Dicho haplotipo ancestral no está presente en la base de datos de secuencias actuales, pero, como se ha comentado anteriormente, no puede descartarse su existencia en un pasado remoto.

El **haplogrupo M1** –característico de África del Este– se conecta mediante un *median vector* (mv9) al haplotipo 336 (16223T-16311C) del haplogrupo L3. Dentro de este haplogrupo, el haplotipo 304 exhibe la combinación de mutaciones 16182C-16183C-16189C, presente en la muestra 1PI del Median Joining Network europeo (**Figura FR70**).

El diagrama recoge también los haplogrupos asiático-americanos C y D, que radian desde el nodo central 16223T (haplotipo 101). El haplogrupo D está representado únicamente por el haplotipo 626 (16223T-16362C). En el haplogrupo C se incluyen 3 haplotipos, uno de los cuales corresponde a la muestra antigua del yacimiento neolítico de Tell Ramad TR19. En el esquema, la secuencia de TR19 se genera a partir del haplotipo 118 (16223T-16298C-16325T-16327T) mediante la reversión de la mutación 16223T y la adquisición de la transición 16224C. La escasez de haplotipos pertenecientes a este haplogrupo en la base de datos impide determinar cuál de los dos eventos tuvo lugar en primer lugar. Sin embargo, la búsqueda en la base de datos “Mitochondrial DNA Concordance Versión 2.0” (MILLER *et al.* 1996) reveló la presencia del intermediario 16298C-16325C-16327T en una momia antigua de Colombia clasificado como haplogrupo C (MONSALVE *et al.* 1996). La ausencia del otro intermediario (16223T-16224C-16298C-16325T-16327T) sitúa la pérdida de la mutación 16223T como anterior a la adquisición de la transición 16224C.

6.3.3.2. *Haplotipos compartidos entre poblaciones antiguas y actuales*

Las 35 muestras de las que se pudo obtener una secuencia completa de 244pb, presentan 25 haplotipos diferentes, seis de los cuales están compartidos entre diferentes muestras mientras que 19 son haplotipos únicos dentro de estas poblaciones antiguas.

Cuando se estudia la frecuencia y distribución de estos haplotipos en la base de datos de 2851 individuos de 38 poblaciones diferentes (**Tabla R80**), se comprueba que sólo 11 de estos 25 haplotipos antiguos (44%) están representados, pudiendo considerarse los 14 restantes (56%) como haplotipos únicos dentro del conjunto de poblaciones actuales.

El haplotipo correspondiente a la secuencia consenso (*CRS*) para este fragmento, está presente en una muestra del yacimiento de Abauntz y en una de las muestras de El Pirulejo y aparece representado en todas las poblaciones actuales de la base de datos exceptuando a la población Saami y a la población de Próximo Oriente. Los haplotipos 16304C y 16311C –presentes en dos muestras del yacimiento neolítico sirio de Tell Halula–, se encuentran también ampliamente distribuidos en las poblaciones actuales estudiadas, aunque su frecuencia individual es menor. El primero de ellos está presente en 17 de las 38 poblaciones actuales estudiadas procedentes de Europa, Próximo Oriente y África, mientras que el segundo aparece en 26 poblaciones de los tres continentes. El haplotipo 16224C-16311C de la muestra TR12 de Tell Ramad caracteriza al haplogrupo K europeo y está representado en 25 poblaciones de la base de datos de secuencias actuales.

Otros haplotipos están también presentes en las poblaciones actuales, pero de forma más restringida. Es el caso del haplotipo 16256T, característico de una muestra de Abauntz, y que aparece únicamente en las poblaciones actuales de Finlandia, Sicilia, Italia del Sur, Noruega y África del Oeste. El haplotipo 16356C está representado en siete poblaciones europeas, además de en Turquía y África del Oeste. El haplotipo 16223T –característico de tres muestras antiguas de diferentes yacimientos– aparece en ocho poblaciones europeas, tres poblaciones africanas, y la población turca de Próximo Oriente.

Por último, hay tres haplotipos que presentan actualmente una distribución geográfica restringida a una única población o a un pequeño grupo de poblaciones. Es el caso del haplotipo 16224C-16311C-16366T, característico de dos muestras del yacimiento neolítico de Siria de Tell Ramad, y presente en tres muestras del grupo druso de Israel. Por otra parte, el haplotipo de la muestra 2H20 de Tell Halula (16223T-16261T-16278T-16294T-16309G), sólo aparece en un individuo de África del Oeste, más concretamente procedente de la población Yoruba (WATSON *et al.* 1997). El haplotipo 16126C-16311C –presente en tres muestras de los yacimientos de Abauntz, Tres Montes y Nerja–, se encuentra hoy día únicamente en tres muestras procedentes de tres poblaciones de Próximo Oriente de Kurdistán, Siria e Israel (grupo Druso) así como en la población de África del Oeste.

Tabla R80. Distribución y frecuencia absoluta de los haplotipos recuperados de muestras antiguas en diferentes poblaciones actuales. AL: Alemania; AUS: Austria; BUL: Bulgaria; CAN: Canarias; SAR: Cerdeña; FR: Francia; GAL: Galicia; TUS: Toscana; KUR: Kurdistán; SUEC: Suecia; PV: País Vasco; AFRC: África Sur; AFRE: África Este; AFRO: África Oeste; ALB: Albania; AND: Andalucía; BEL: Bélgica; CAT: Cataluña; DEN: Dinamarca; DRUZ: Drusos Israel; EST: Estonia; FIN: Finlandia; GEO: Georgia; GB: Gran Bretaña; GRE: Grecia; SIC: Sicilia; ITSU: Italia del Sur; NOR: Noruega; JOR: Jordania; POR: Portugal; RKAR: Rusia Karelian; RNC: Rusia Norte del Cáucaso; SAA: Saami; SIR: Siria; SUIZ: Suiza; TUR: Turquía; NIL: Valle del Nilo.

Yacimiento	Muestra	Haplotipo	AL	AU	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	SUE	PV	ALB	AND	BEL	CAT	DEN	EST	FIN	GE	GB	GRE	SIC
Abauntz	AB5	CRS	2	23	3	8	15	5	31	9	2	10	7	2	2	4	8	3	27	10	14	7	13
Abauntz	AB17	256T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2
Abauntz	AB9	126C,311C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tres Montes	2TM4	224C	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
Tres Montes	1TM5	126C,311C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tres Montes	1TM2	261T,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tres Montes	1TM6	261T,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tres Montes	TM11	261T,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerja	2NE	126C,311C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerja	3NE	193T,311C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerja	4NE	129A,264T,270T,278T,293G,311C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerja	5NE	126C,264T,270T,278T,293G,311C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
El Pirulejo	1PI	182C,183C,189C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
El Pirulejo	2PI	CRS	2	23	3	8	15	5	31	9	2	10	7	2	2	4	8	3	27	10	14	7	13
Toledo	TO1	223T	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Mari	1MA1	256T,297C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mari	2MA2	356C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-
Mari	1MA5	223T,356C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mari	3MA11	126C,145A,231C,356C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mari	2MA10	223T	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Mari	1MA12	223T,256T,261T,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Halula	TH5-TH6	311C	-	2	1	1	3	3	2	-	1	2	2	-	2	1	2	1	2	-	-	-	1
Tell Halula	IH14	304C	-	-	-	-	1	1	2	1	-	3	-	-	-	-	1	3	-	2	-	2	1
Tell Halula	TH2	224C	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
Tell Halula	IH17	224C	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
Tell Halula	IH15	223T	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Tell Halula	H12	266T,294T,304C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Halula	2H20	223T,261Y,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Ramad	TR14	224C,293C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Ramad	TR12	224C,311C	1	4	3	-	2	2	3	2	-	-	-	2	2	-	-	2	1	1	2	2	2
Tell Ramad	TR16	224C,311C,366T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Ramad	TR18	224C,311C,366T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Ramad	TR19	224C,298C,325C,327T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Ramad	TR8	147A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Día de	DJ1	218T-294T-304C-320T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla R80. (Continuación).

2018T001 (Continued group)																			
Población	Muestra	Haplotipo	ITSU NOR POR RKAR RNORC SAA SUIZ KUR DRUZ JOR SIR TUR AFRC AFRS AFRE AFRO NIL																
Abauntz	AB5	CRS	8	48	14	13	28	-	2	5	6	-	2	4	-	-	-	10	6
Abauntz	AB17	256T	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
Abauntz	AB9	126C,311C	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	1	-
Tres Montes	2TM4	224C	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tres Montes	1TM5	126C,311C	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	1	-
Tres Montes	1TM2	261T,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tres Montes	1TM6	261T,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tres Montes	TM11	261T,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerija	2NE	126C,311C	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	1	-
Nerija	3NE	193T,311C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerija	4NE	129A,264T,270T,278T,293G,311C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerija	5NE	126C,264T,270T,278T,293G,311C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
El Pirulejo	1PI	182C,183C,189C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
El Pirulejo	2PI	CRS	8	48	14	13	28	-	2	5	6	-	2	4	-	-	-	10	6
Toledo	TO1	223T	-	-	1	-	2	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	4	3
Mari	1MA1	256T,297C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mari	2MA2	356C	-	4	1	3	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-
Mari	1MA5	223T,356C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mari	3MA11	126C,145A,231C,356C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mari	2MA10	223T	-	-	1	-	2	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1	4	3
Mari	1MA12	223T,256T,261T,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Halula	TH5-TH6	311C	-	1	1	2	-	1	2	2	1	2	1	1	-	-	-	1	-
Tell Halula	1H14	304C	-	5	-	3	1	1	-	-	-	-	1	2	-	-	-	1	-
Tell Halula	TH2	224C	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Halula	1H17	224C	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Halula	1H15	223T	-	-	1	-	2	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1	4	3
Tell Halula	H12	266T,294T,304C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Halula	2H20	223T,261Y,278T,294T,309G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Tell Ramad	TR8	147A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Ramad	TR14	224C,293C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tell Ramad	TR12	224C,311C	1	2	3	1	1	-	1	-	1	3	-	1	-	-	1	5	2
Tell Ramad	TR16	224C,311C,366T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
Tell Ramad	TR18	224C,311C,366T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
Tell Ramad	TR19	224C,298C,325C,327T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Día de	DJ1	218T-294T-304C-320T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6.4. Haplogrupos mitocondriales

6.4.1. Asignación de haplogrupos a las muestras

La asignación de haplogrupo mitocondrial a las secuencias antiguas obtenidas fue realizada de acuerdo con lo descrito en el apartado 16.8.1. del capítulo “Métodos”. Los resultados de dicha asignación se resumen en la **Tabla R81**.

A través de la presencia de posiciones diagnóstico en la HVRI se consiguió asignar con éxito –y de forma no ambigua– el haplogrupo a 11 muestras para las que se había obtenido una secuencia de 244pb. Los individuos AB9, 1TM5 y 2NE presentan la sustitución 16126C característica tanto del haplogrupo J como del supercluster JT. Para su asignación a uno u otro haplogrupo sería necesario disponer de información de la posición 16069, no incluida dentro de la región secuenciada. Sin embargo, puesto que el motivo mitocondrial de estas muestras (16126C-16311C) aparece clasificado como J en la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000, y se agrupa junto con otros miembros de este cluster en las reconstrucciones de Neighbor-Joining (**Figura FR68**) y Median Joining Network (**Figura FR70**), se consideró que estas muestras pertenecían al haplogrupo J. El haplotipo del individuo 3MA11 del yacimiento de Mari presenta tres sustituciones características del subcluster J1a del haplogrupo J, aunque carece de la transición 16261T que distingue el J1. Además de estas mutaciones, el linaje de 3MA11 exhibe el cambio 16356C típico del haplogrupo U4. El árbol filogenético de Neighbor-Joining (**Figura FR68**) no proporciona una resolución a nivel de subcluster de manera que este haplotipo se agrupa con representantes de los subclusters J1a y J1b. Ahora bien, en la reconstrucción de Median Joining Network de linajes europeos (**Figura FR70**) esta secuencia ocupa una posición terminal dentro del subcluster J1a del haplogrupo J. En base a estos resultados, y a pesar de carecer de una de las sustituciones diagnóstico del subcluster J1a, la secuencia de 3MA11 fue clasificada como J1a.

Los haplotipos de los individuos TR12, TR16 y TR18 pertenecen, sin lugar a dudas, al haplogrupo K por exhibir las dos sustituciones definitorias del mismo: las transiciones 16224C y 16311C. Del mismo modo, las secuencias de 1MA5 y 2MA2 presentan la transición 16356C característica del subcluster U4 del haplogrupo U.

Los individuos 2H20 y 1MA12 presentan dos sustituciones típicas del haplogrupo L2: las transiciones 16223T y 16278T. El tercer cambio que caracteriza a los miembros de este haplogrupo, la mutación 16390G→A, está fuera del segmento analizado. Sin embargo, ya que la combinación de mutaciones presentes en las dos muestras aparece sólo en miembros del haplogrupo L2 (WATSON *et al.* 1997), es razonable asignar tales haplotipos al haplogrupo L2. Este mismo criterio fue empleado para la inclusión de los individuos 1TM2, 1TM6 y TM11 –carentes además del cambio 16223T–, en el haplogrupo L2. El hecho de que todas estas secuencias se incluyan en este haplogrupo en ambos árboles filogenéticos, Neighbor-Joining (**Figura FR68**) y Median Joining Network (**Figura FR70**), contribuye a reforzar esta hipótesis.

Algo similar sucede con los individuos 4NE y 5NE. El segundo presenta cinco de las ocho posiciones diagnósticas del haplogrupo L1b, mientras que en el primero se han hallado sólo cuatro. Aunque ninguno de los dos haplotipos aparece en el estudio de WATSON *et al.* 1997, por su gran similitud con algunas secuencias del haplogrupo L1b y por la información de los árboles filogenéticos, fueron asignados a éste.

Los individuos TO1, 1H15 y 2MA10 presentan la sustitución 16223T, que, en combinación con otras, caracteriza a los haplogrupos asiáticos, americanos nativos, africanos y a algunos europeos como el N1a, N1b, N1c, I, W y X. El motivo formado por esta única sustitución en la región Hipervariable I aparece clasificado en la relación de haplotipos de WATSON *et al.* 1997 como L3a y así han sido asignadas estas secuencias antiguas.

El individuo TR19 presenta dos sustituciones características del haplogrupo C (16298C y 16327C) y carece, sin embargo, del cambio asociado 16223T. Tanto el árbol filogenético de Neighbor-Joining (**Figura FR68**) como el Median Joining Network (**Figura FR71**) relacionan esta secuencia con otras actuales del haplogrupo C. Adicionalmente, la transición 16325C, presente en TR19, caracteriza a algunos miembros del haplogrupo C. Es por todo ello por lo que se consideró la secuencia de TR19 como perteneciente a este haplogrupo.

Como ya se ha comentado en la descripción del Median Joining Network de los haplogrupos europeos (**Figura FR70**), los individuos DJ1 y H12 presentan una

sustitución característica del haplogrupo T (16294T) aunque carecen de la otra posición diagnóstico (16126C). El resto de mutaciones de estas secuencias acostumbran a acompañar a representantes de este haplogrupo, aunque también aparecen asociadas a miembros del haplogrupo H. Con esta única información, y de acuerdo con lo descrito anteriormente, resulta del todo imposible decantarse por una u otra posibilidad.

Las secuencias de los restantes individuos (AB5, 2PI, AB17, 1H14, TR14, 2TM4, TH2, 1H17, TH5, TR8, 3NE, 1MA1 y 1PI) carecen de sustituciones marcadoras de haplogrupos en la región analizada. El haplotipo para esta región de los dos primeros de ellos es igual a la secuencia consenso o *CRS*. Este haplotipo aparece asociado mayoritariamente al haplogrupo H, aunque, además, incluye a representantes de otros haplogrupos minoritarios como el U, R, pre-HV o HV, para cuya distinción es necesaria la información de otras posiciones adicionales. En la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000, los motivos de AB17, 1H14, 2TM4, TH2, 1H17 y TH5 figuran también relacionados con más de un haplogrupo. La frecuencia de los haplotipos en cada haplogrupo en esta misma relación puede servir como orientación a la hora de determinar el haplogrupo *más probable* al que pertenecen. Los motivos 16304C (1H14) y *CRS* (AB5 y 2PI) aparecen asociados al haplogrupo H en un 94.15% y un 98.6% de los casos, por lo que puede afirmarse que probablemente pertenecen a este haplogrupo. El haplotipo 16311C (TH5) está asociado mayoritariamente al haplogrupo HV, con una frecuencia del 68% y el 16224C (2TM4, TH2, 1H17) al haplogrupo K (66.6%), por lo que también resulta probable –aunque no tanto como en los casos anteriores–, que estas secuencias antiguas pertenezcan a estos haplogrupos.

Los haplotipos de los individuos TR8, 3NE, 1MA1 y 1PI no están representados en los trabajos de RICHARDS *et al.* 2000 y WATSON *et al.* 1997. Las secuencias de TR8 y 1MA1 fueron incluidas dentro del haplogrupo H de acuerdo con la información obtenida de las reconstrucciones filogenéticas de Neighbor-Joining (**Figura FR68**) y Median Joining Network (**Figura FR70**), mientras que las de TR14, 3NE y 1PI no pudieron ser clasificadas.

Algunos de los individuos para los que se obtuvo una secuencia parcial de 112pb (posiciones 16258-16369) presentan un patrón mutacional característico de ciertos haplogrupos, por lo que se les asignó haplogrupo de forma provisional. De esta

manera el haplotipo de GA22 (16293T-16242T) fue clasificado como H en base a la relación de haplotipos de RICHARDS *et al.* 2000 mientras que el haplotipo parcial 16261T-16278T-16294T-16309G de AB14 y 2H31 –presente también en otras muestras analizadas–, fue clasificado como L2. Las restantes muestras para las que se dispone de una secuencia parcial no pudieron ser clasificadas y aparecen en la tabla con un interrogante.

Respecto a la clasificación final es importante tener en cuenta que las secuencias recuperadas y analizadas son secuencias antiguas mientras que los criterios de clasificación de haplogrupos se basan en secuencias actuales. Asimismo, conviene considerar que la composición genética de las poblaciones puede haber variado sustancialmente a lo largo del tiempo.

Tabla R81. Clasificación de las secuencias antiguas obtenidas en haplogrupos mitocondriales. Las posiciones diagnósticas de haplogrupos se señalan en negrita. En los casos en que un haplotipo puede pertenecer a más de un haplogrupo se señalan todas las posibilidades. En las secuencias parciales se señala con un guión el fragmento que falta. ?: Haplogrupo no asignado. *CRS*: Secuencia consenso (ANDERSON *et al.* 1981).

Muestra	Posiciones secuenciadas	Haplotipo	Haplogrupo
AB5	16126-16369	<i>CRS</i>	H
2PI	16126-16369	<i>CRS</i>	H
AB13	16126-16258	<i>CRS</i> -	?
2TM1	16126-16258	<i>CRS</i> -	?
2H11-3H11	16126-16258	<i>CRS</i> -	?
2H13	16126-16258	<i>CRS</i> -	?
1H18	16126-16258	<i>CRS</i> -	?
1H21	16126-16258	<i>CRS</i> -	?
1MA4-2MA4	16126-16258	<i>CRS</i> -	?
1MA6	16126-16258	<i>CRS</i> -	?
AB15	16258-16369	- <i>CRS</i>	?
AT19	16286-16320	- <i>CRS</i>	?
TH8	16258-16369	- <i>CRS</i>	?
1H28	16258-16369	- <i>CRS</i>	?
DJ3	16258-16369	- <i>CRS</i>	?
1DJ6-2DJ6	16258-16369	- <i>CRS</i>	?
1MA3	16258-16369	- <i>CRS</i>	?
1MA8	16258-16369	- <i>CRS</i>	?
GA22	16168-16366	239T,242T	H
AB17	16126-16369	256T	H
1H14	16126-16369	304C	H
CA7	16258-16369	-304C	?
2H9	16258-16369	-304C	?
DJ1	16126-16258	218T, 294T ,304C,320T	H/T
H12	16126-16369	266T, 294T ,304C	H/T
1H24	16258-16369	- 294T ,304C,320T	H/T
2H25	16258-16369	-327T	?
2MA2	16126-16369	356C	U4
1MA5	16126-16369	223T, 356C	U4
TR14	16126-16369	224C,293C	?
2TM4	16126-16369	224C	H/K
TH2	16126-16369	224C	H/K
1H17	16126-16369	224C	H/K
TH4	16126-16258	224Y-	?
TR7	16126-16258	224C-	?
TH5-TH6	16126-16369	311C	H/HV/HV1/R/U
1H2	16258-16369	-311C	?
1H32	16258-16369	-311C	?
1H33	16258-16369	-311C	?
TR12	16126-16369	224C,311C	K
TR16	16126-16369	224C,311C ,366T	K
TR18	16126-16369	224C,311C ,366T	K
TR19	16126-16369	224C, 298C ,325C, 327T	C
AB9	16126-16369	126C ,311C	J*
1TM5	16126-16369	126C ,311C	J*
2NE	16126-16369	126C ,311C	J*
3MA11	16126-16369	126C,145A,231C,356C	J1a
TO1	16126-16369	223T	L3a
1H15	16126-16369	223T	L3a
2MA10	16126-16369	223T	L3a

Tabla R81. (Continuación).

Muestra	Posiciones secuenciadas	Haplotipo	Haplogrupo
AB14	16258-16369	-261T, 278T ,294T,309G	L2
2H31	16258-16369	-261T, 278T ,294T,309G	L2
2H20	16126-16369	223T ,261T, 278T ,294T,309G	L2
1MA12	16126-16369	223T ,256T,261T, 278T ,294T,309G	L2
1TM2	16126-16369	261T, 278T ,294T,309G	L2
1TM6	16126-16369	261T, 278T ,294T,309G	L2
TM11	16126-16369	261T, 278T ,294T,309G	L2
4NE	16126-16369	129A, 264T , 270T , 278T ,293G, 311C	L1b
5NE	16126-16369	126C , 264T , 270T , 278T ,293G, 311C	L1b
TR8	16126-16369	147A	H
3NE	16126-16369	192T,311C	?
1MA1	16126-16369	256T,297C	H
1PI	16126-16369	182C,183C,189C	?
AB20	16126-16258	215G,227G-	?
AT18	16258-16369	-286G	?
AT27	16286-16331	-320T,331?	?
TR9-TR11	16258-16369	-293C	?

6.4.2. Frecuencias de haplogrupos

La **Tabla R82** muestra el porcentaje de los diferentes haplogrupos y subhaplogrupos en cada población. La clasificación de las secuencias actuales en haplogrupos fue realizada de acuerdo con RICHARDS *et al.* 2000. A las secuencias no clasificadas con este criterio se le asignó el mismo haplogrupo con el que aparecen en la publicación original. Así se consiguió clasificar con éxito 1004 haplotipos de los 1090 presentes en la base de datos de secuencias actuales. Las líneas no clasificadas con los criterios anteriores figuran en la tabla como “sin clasificar”. En las **Figuras FR72, FR73 y FR74** se relacionan los porcentajes de los haplogrupos, en cada población, en forma de diagrama circular.

Las frecuencias de los diferentes haplogrupos obtenidas para el conjunto de poblaciones actuales europeas y de Próximo Oriente son muy similares a las de RICHARDS *et al.* 2000, con algunas excepciones. Este es el caso del haplogrupo U2, ausente en nuestra muestra y presente en un 0.64% en Europa y en un 0.83% en Próximo Oriente según estos autores. De forma inversa, los haplogrupos Europeos U6, N1a y N1c, ausentes en la muestra europea y de Próximo Oriente de RICHARDS *et al.* 2000, aparecen representados en nuestro conjunto de poblaciones. Nuestra muestra incluye además, aunque en baja proporción, representantes de los haplogrupos asiático-americanos A, C y D y africanos M1, L1, L2 y L3.

El haplogrupo mayoritario en todas las poblaciones europeas actuales es el H, a excepción de los Saami –en los que predomina el subcluster U5 del haplogrupo U– (45.56%) y la población sueca –con un mayor porcentaje de haplogrupo V (48%), seguido por U5 (32%)–. El haplogrupo H es también el más abundante en todas las poblaciones de Próximo Oriente excepto en los drusos, entre los que es mayoritario el haplogrupo K. Su frecuencia promedio es, sin embargo, aproximadamente la mitad que en poblaciones europeas (20.24%). En África este haplogrupo está presente únicamente en África del Oeste; y en el Valle del Nilo en frecuencia menor que en Próximo Oriente.

La composición y frecuencia de los diferentes haplogrupos entre las poblaciones europeas y de Próximo Oriente es a grandes rasgos similar, sin embargo existen ciertas diferencias que merecen ser comentadas. Individualmente consideradas, las poblaciones

de Próximo Oriente presentan mayor diversidad de haplogrupos que la mayoría de poblaciones europeas, especialmente las poblaciones de Jordania, Israel (Drusos) y Siria. Este aumento de diversidad es debido en parte al aumento de la frecuencia de ciertos haplogrupos, algunos minoritarios en Europa como el D, HV1, U1, U7, N1b ó X, y otros de frecuencia considerable, como el J o el K en detrimento del haplogrupo H. El aumento de la frecuencia de ciertos subclusters –como el T1 y J1– merece ser tenido también en consideración por sus implicaciones poblacionales como se verá más adelante. Por otra parte, haplogrupos de elevada frecuencia en Europa –como el V o el U5– están representados en Próximo Oriente en muy baja frecuencia.

Tabla R82. Frecuencia relativa de haplogrupos (Hapl.) y subhaplogrupos (subh.) en las diferentes poblaciones actuales y antiguas estudiadas. La categoría “sin asignar” (S.A.) incluye aquellos haplotipos no clasificados.

Hapl.	Subh.	Europa													
		AL	AUS	BUL	CAN	SAR	FR	GAL	TUS	SUEC	PV	ALB	AND	BEL	CAT
A		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C		0.00	0.00	0.00	1.85	0.00	1.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D		0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HV		57.14	50.00	32.26	33.33	53.52	54.90	69.57	36.00	60.00	64.44	50.00	26.67	56.00	50.00
	H	51.02	49.00	29.03	29.63	49.30	47.06	65.22	36.00	12.00	53.33	41.30	26.67	52.00	31.25
	V	4.08	1.00	0.00	3.70	1.41	5.88	3.26	0.00	48.00	11.11	2.17	0.00	4.00	18.75
	HV1	2.04	0.00	3.23	0.00	2.82	1.96	1.09	0.00	0.00	0.00	6.52	0.00	0.00	0.00
I		2.04	3.00	3.23	0.00	2.82	1.96	1.09	4.00	0.00	0.00	10.87	6.67	0.00	0.00
J		4.08	11.00	9.68	3.70	5.63	5.88	7.61	18.00	0.00	4.44	6.52	13.33	12.00	6.25
	J*	2.04	6.00	6.45	1.85	2.82	1.96	6.52	10.00	0.00	2.22	4.35	0.00	8.00	0.00
	J1	2.04	5.00	3.23	1.85	0.00	1.96	0.00	4.00	0.00	2.22	2.17	13.33	4.00	0.00
	J2	0.00	0.00	0.00	0.00	2.82	1.96	1.09	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.25
	J3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
L1		0.00	0.00	0.00	3.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.17	0.00	0.00	0.00
	L1a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.17	0.00	0.00	0.00
	L1b	0.00	0.00	0.00	3.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1d	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1e	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1f	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1i	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
L2		0.00	0.00	0.00	3.70	1.41	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
L3		2.04	0.00	0.00	3.70	0.00	1.96	2.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L3*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L3a	2.04	0.00	0.00	3.70	0.00	1.96	1.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L3b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L3c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L3e	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M1		0.00	0.00	0.00	0.00	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00
N		0.00	0.00	0.00	0.00	1.41	1.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	N1a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	N1b	0.00	0.00	0.00	0.00	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	N1c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pre-HV		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
R		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00	0.00	0.00
T		12.24	10.00	9.68	9.26	12.68	7.84	2.17	8.00	0.00	4.44	4.35	6.67	4.00	0.00
	T*	4.08	5.00	0.00	0.00	2.82	5.88	2.17	2.00	0.00	2.22	2.17	0.00	0.00	0.00
	T1	2.04	2.00	3.23	5.56	2.82	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.67	4.00	0.00
	T2	2.04	2.00	3.23	1.85	1.41	1.96	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	T3	2.04	0.00	3.23	1.85	5.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	T4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	T5	2.04	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00	2.22	2.17	0.00	0.00	0.00
U		14.29	22.00	38.71	24.07	18.31	15.69	13.04	22.00	36.00	15.56	19.57	26.67	16.00	25.00
	K	2.04	7.00	12.90	1.85	5.63	5.88	4.35	6.00	0.00	0.00	2.17	20.00	12.00	0.00
	U*	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	U1	0.00	0.00	0.00	0.00	2.82	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	2.17	0.00	0.00	6.25
	U3	0.00	1.00	9.68	0.00	2.82	1.96	0.00	2.00	0.00	0.00	2.17	0.00	0.00	6.25
	U4	2.04	5.00	6.45	3.70	0.00	5.88	1.09	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.50
	U5	8.16	8.00	9.68	7.41	7.04	1.96	4.35	6.00	32.00	15.56	13.04	6.67	4.00	0.00
	U6	0.00	0.00	0.00	11.11	0.00	0.00	2.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	U7	2.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
W		4.08	1.00	0.00	1.85	1.41	0.00	2.17	2.00	0.00	0.00	0.00	6.67	0.00	12.50
X		2.04	1.00	6.45	1.85	1.41	1.96	1.09	4.00	0.00	4.44	0.00	6.67	0.00	6.25
Z		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
S.A.		2.04	1.00	0.00	12.96	0.00	3.92	0.00	4.00	4.00	0.00	6.52	0.00	12.00	0.00

Tabla R82. (Continuación).

Hapl.	Subh.	Europa														Total
		DEN	EST	FIN	GEO	GB	GRE	SIC	ITSU	NOR	POR	RKA	RNC	SAA	SUIZ	
A		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05
C		0.00	0.00	0.00	1.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.65	0.00	0.00	0.44
D		0.00	0.00	0.00	1.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.92	0.00	2.41	2.12	0.00	0.00	0.60
E		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.05
HV		62.50	50.00	52.74	38.98	55.43	57.78	53.23	43.24	53.46	54.55	46.99	35.45	41.11	58.82	49.73
	H	59.38	50.00	43.84	30.51	52.17	55.56	45.16	40.54	49.31	49.09	40.96	32.80	3.33	41.18	42.53
	V	3.13	0.00	8.90	3.39	3.26	2.22	8.06	2.70	4.15	3.64	6.02	0.00	37.78	17.65	6.21
	HV1	0.00	0.00	0.00	5.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.82	0.00	2.65	0.00	0.00	0.99
I		0.00	0.00	3.42	11.86	3.26	2.22	1.61	0.00	0.92	1.82	1.20	8.99	0.00	0.00	3.02
J		18.75	7.69	6.16	3.39	13.04	11.11	8.06	5.41	6.45	5.45	6.02	4.23	0.00	17.65	7.03
	J*	9.38	7.69	4.79	3.39	7.61	4.44	4.84	5.41	5.07	5.45	6.02	2.12	0.00	11.76	4.51
	J1	9.38	0.00	0.00	0.00	5.43	4.44	1.61	0.00	1.38	0.00	0.00	1.06	0.00	5.88	1.81
	J2	0.00	0.00	1.37	0.00	0.00	2.22	1.61	0.00	0.00	0.00	0.00	1.06	0.00	0.00	0.71
	J3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
L1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22
	L1a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05
	L1b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16
	L1c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1d	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1e	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1f	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1i	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
L2		0.00	0.00	0.00	1.69	0.00	0.00	0.00	2.70	0.00	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.38
L3		0.00	0.00	0.00	0.00	1.09	2.22	1.61	5.41	0.46	3.64	0.00	2.12	0.00	5.88	1.04
	L3*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L3a	0.00	0.00	0.00	0.00	1.09	2.22	1.61	5.41	0.00	3.64	0.00	2.12	0.00	5.88	0.93
	L3b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
	L3c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L3e	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
M1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
N		0.00	3.85	0.00	1.69	0.00	0.00	1.61	2.70	1.84	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.60
	N1a	0.00	3.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.16
	N1b	0.00	0.00	0.00	1.69	0.00	0.00	1.61	2.70	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33
	N1c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11
Pre-HV		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.22	0.00	0.00	0.00	1.82	0.00	0.00	7.78	0.00	0.55
R		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.70	0.00	0.00	0.00	2.12	0.00	0.00	0.44
T		6.25	11.54	7.53	11.86	5.43	11.11	1.61	13.51	7.83	10.91	7.23	7.41	0.00	5.88	7.25
	T*	6.25	11.54	3.42	3.39	2.17	0.00	1.61	8.11	3.69	3.64	1.20	5.29	0.00	0.00	3.08
	T1	0.00	0.00	2.05	3.39	1.09	4.44	0.00	2.70	0.46	3.64	3.61	1.06	0.00	0.00	1.54
	T2	0.00	0.00	1.37	0.00	2.17	0.00	0.00	0.00	1.84	1.82	1.20	0.00	0.00	5.88	1.04
	T3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.44	0.00	0.00	0.46	1.82	0.00	1.06	0.00	0.00	0.71
	T4	0.00	0.00	0.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.20	0.00	0.00	0.00	0.16
	T5	0.00	0.00	0.00	5.08	0.00	2.22	0.00	2.70	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.66
U		9.38	19.23	21.92	20.34	20.65	11.11	11.29	8.11	24.42	20.00	30.12	22.75	45.56	5.88	21.70
	K	3.13	0.00	2.05	5.08	9.78	4.44	4.84	2.70	5.53	7.27	2.41	4.23	0.00	0.00	4.51
	U*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.61	0.00	0.00	0.00	1.20	0.00	0.00	0.00	0.22
	U1	0.00	0.00	0.00	3.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	3.17	0.00	0.00	0.77
	U3	0.00	0.00	0.00	3.39	0.00	0.00	3.23	0.00	1.38	1.82	0.00	5.82	0.00	0.00	1.59
	U4	0.00	3.85	2.74	3.39	2.17	0.00	1.61	0.00	2.76	5.45	8.43	3.17	0.00	0.00	2.75
	U5	6.25	15.38	17.12	5.08	8.70	6.67	0.00	5.41	14.29	0.00	18.07	5.82	45.56	5.88	11.04
	U6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60
	U7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.53	0.00	0.00	0.22
W		3.13	7.69	5.48	1.69	0.00	0.00	4.84	2.70	0.92	0.00	3.61	0.53	0.00	5.88	1.87
X		0.00	0.00	2.05	0.00	0.00	0.00	3.23	2.70	0.92	1.82	1.20	0.00	0.00	0.00	1.32
Z		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	1.11	0.00	0.11
S.A.		0.00	0.00	0.68	5.08	1.09	2.22	12.90	8.11	0.46	0.00	1.20	10.05	4.44	0.00	3.41

Tabla R82. (Continuación).

Hapl.	Subh.	Próximo Oriente						África					
		KUR	DRUZ	SIR	TUR	JOR	Total	AFRC	AFRS	AFRE	AFRO	NIL	Total
A		0.00	0.00	0.00	0.00	2.27	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C		0.00	0.00	0.00	2.78	0.00	0.81	0.00	0.00	0.00	0.70	0.00	0.38
D		0.00	0.00	0.00	5.56	0.00	1.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.25
E		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HV		42.86	18.87	32.00	20.83	11.36	23.48	0.00	0.00	0.00	13.35	11.67	10.64
	H	42.86	9.43	30.00	18.06	11.36	20.24	0.00	0.00	0.00	12.65	9.58	9.64
	V	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00	0.70	1.25	0.75
	HV1	0.00	9.43	0.00	2.78	0.00	2.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.25
I		3.57	11.32	0.00	5.56	2.27	4.86	0.00	0.00	1.19	0.47	2.92	1.25
J		3.57	5.66	8.00	18.06	25.00	12.96	0.00	0.00	1.19	3.51	3.75	3.13
	J*	3.57	3.77	6.00	6.94	6.82	5.67	0.00	0.00	1.19	1.41	1.67	1.38
	J1	0.00	1.89	2.00	6.94	15.91	5.67	0.00	0.00	0.00	0.47	1.25	0.63
	J2	0.00	0.00	0.00	4.17	2.27	1.62	0.00	0.00	0.00	1.41	0.83	1.00
	J3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.00	0.13
L1		0.00	0.00	0.00	1.39	2.27	0.81	79.31	100.00	26.19	11.48	15.42	18.77
	L1a	0.00	0.00	0.00	1.39	2.27	0.81	31.03	0.00	16.67	0.94	7.08	5.51
	L1b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.90	3.33	5.76
	L1c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	44.83	0.00	3.57	0.23	0.83	2.38
	L1d	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	68.42	0.00	0.00	0.00	1.63
	L1e	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.45	0.00	4.76	0.23	3.75	1.88
	L1f	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	0.13
	L1i	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	31.58	1.19	1.17	0.00	1.50
L2		0.00	0.00	0.00	0.00	2.27	0.40	20.69	0.00	16.67	25.29	14.58	20.40
L3		0.00	0.00	0.00	4.17	2.27	1.62	0.00	0.00	46.43	23.65	17.50	22.78
	L3*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70	0.83	0.63
	L3a	0.00	0.00	0.00	4.17	2.27	1.62	0.00	0.00	44.05	13.35	14.17	16.02
	L3b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.43	2.08	5.13
	L3c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.38	0.70	0.42	0.75
	L3e	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.47	0.00	0.25
M1		0.00	1.89	0.00	0.00	2.27	0.81	0.00	0.00	2.38	0.00	5.00	1.75
N		3.57	3.77	0.00	1.39	2.27	2.02	0.00	0.00	1.19	0.23	1.67	0.75
	N1a	0.00	0.00	0.00	1.39	0.00	0.40	0.00	0.00	1.19	0.00	0.83	0.38
	N1b	3.57	1.89	0.00	0.00	2.27	1.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.83	0.25
	N1c	0.00	1.89	0.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00	0.23	0.00	0.13
Pre-HV		0.00	3.77	0.00	0.00	9.09	2.43	0.00	0.00	3.57	0.00	4.58	1.75
R		0.00	0.00	0.00	1.39	2.27	0.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T		3.57	3.77	14.00	9.72	11.36	8.91	0.00	0.00	0.00	5.39	8.33	5.38
	T*	3.57	0.00	4.00	2.78	4.55	2.83	0.00	0.00	0.00	0.70	1.25	0.75
	T1	0.00	3.77	6.00	5.56	4.55	4.45	0.00	0.00	0.00	0.00	4.58	1.38
	T2	0.00	0.00	2.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00	1.17	0.83	0.88
	T3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.28	0.83	2.00
	T4	0.00	0.00	0.00	1.39	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	0.13
	T5	0.00	0.00	2.00	0.00	2.27	0.81	0.00	0.00	0.00	0.23	0.42	0.25
U		32.14	28.30	32.00	16.67	15.91	23.89	0.00	0.00	1.19	10.30	5.42	7.26
	K	17.86	13.21	8.00	2.78	0.00	7.29	0.00	0.00	1.19	2.34	1.67	1.88
	U*	0.00	0.00	0.00	5.56	0.00	1.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	U1	3.57	5.66	2.00	0.00	4.55	2.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	0.13
	U3	7.14	5.66	14.00	5.56	6.82	7.69	0.00	0.00	0.00	0.70	1.67	0.88
	U4	0.00	0.00	2.00	2.78	0.00	1.21	0.00	0.00	0.00	0.70	0.00	0.38
	U5	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	0.81	0.00	0.00	0.00	4.45	1.25	2.75
	U6	0.00	0.00	0.00	0.00	4.55	0.81	0.00	0.00	0.00	2.11	0.42	1.25
	U7	3.57	3.77	2.00	0.00	0.00	1.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
W		3.57	0.00	2.00	5.56	0.00	2.43	0.00	0.00	0.00	0.70	0.00	0.38
X		3.57	22.64	2.00	2.78	6.82	7.69	0.00	0.00	0.00	0.47	1.25	0.63
Z		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
S.A.		3.57	0.00	10.00	2.78	2.27	3.64	0.00	0.00	0.00	4.45	7.08	4.51

Tabla R82. (Continuación).

Hapl.	Subh.	Muestra antigua					Total general
		PAL	NEPI	NEPO	MARI	Total	
A		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
C		0.00	0.00	7.14	0.00	2.86	0.48
D		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.59
E		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
HV		20.00	20.00	21.43	16.67	20.00	36.34
	H	20.00	20.00	21.43	16.67	20.00	31.28
	V	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.13
	HV1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.93
I		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.65
J		20.00	20.00	0.00	16.67	11.43	6.51
	J*	20.00	20.00	0.00	0.00	8.57	3.79
	J1	0.00	0.00	0.00	16.67	2.86	1.83
	J2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.86
	J3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
		0.00	20.00	0.00	0.00	5.71	5.44
L1	L1a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.62
	L1b	0.00	20.00	0.00	0.00	5.71	1.76
	L1c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.65
	L1d	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.45
	L1e	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.52
	L1f	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
	L1i	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41
L2		0.00	30.00	7.14	16.67	14.29	6.06
L3		20.00	0.00	7.14	16.67	8.57	7.23
	L3*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17
	L3a	20.00	0.00	7.14	16.67	8.57	5.30
	L3b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.48
	L3c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21
	L3e	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
M1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.62
N		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.76
	N1a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24
	N1b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38
	N1c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14
Pre-HV		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.03
R		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34
T		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.79
	T*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.38
	T1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.72
	T2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.93
	T3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
	T4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17
	T5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55
		0.00	10.00	35.71	33.33	22.86	17.91
U	K	0.00	10.00	35.71	0.00	17.14	4.17
	U*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.28
	U1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.76
	U3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.89
	U4	0.00	0.00	0.00	33.33	5.71	2.00
	U5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.75
	U6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.79
	U7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.28
W		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.48
X		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.65
Z		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
S.A.		40.00	0.00	21.43	0.00	14.29	3.86

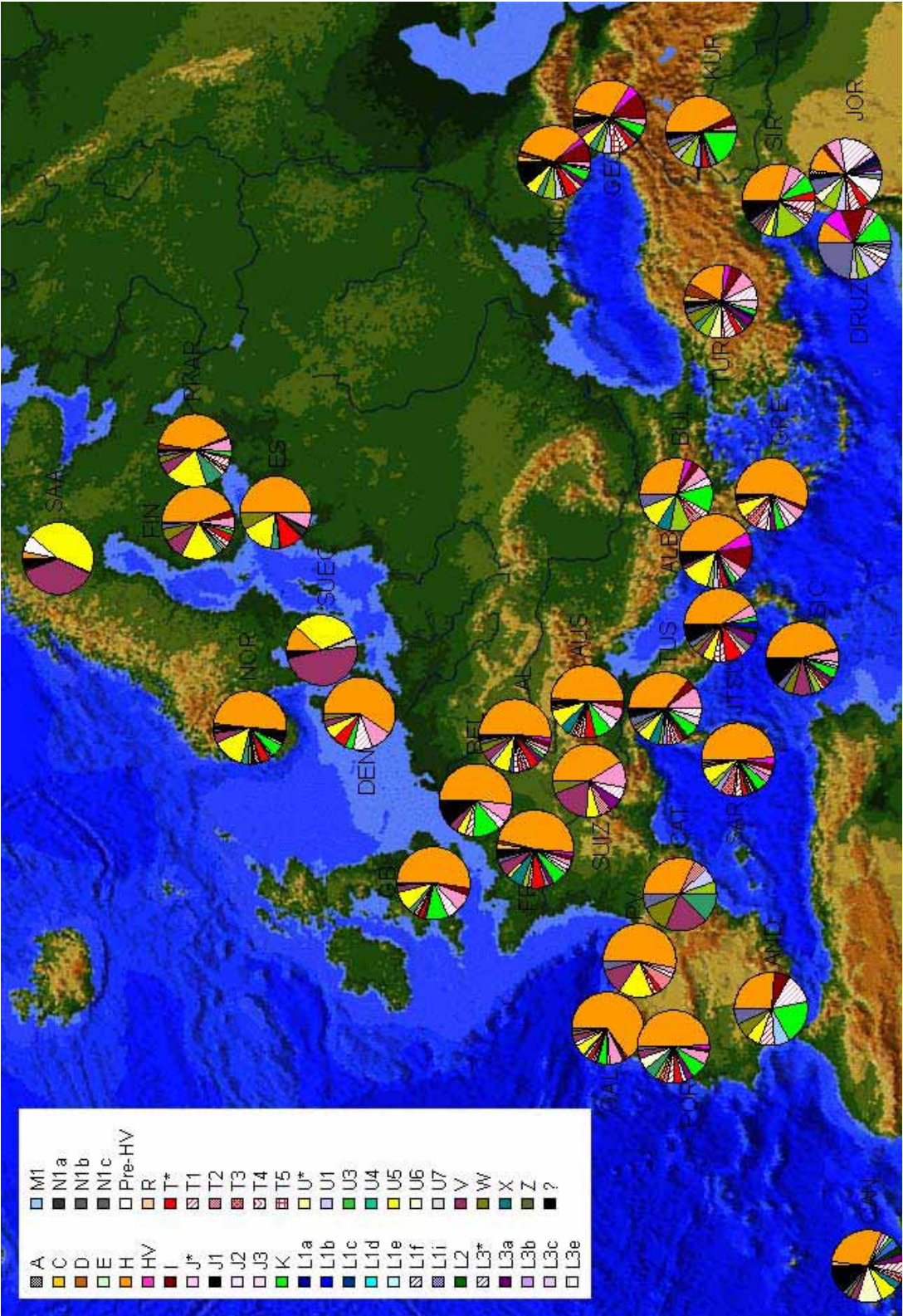


Figura FR72. Mapa de frecuencias de los diferentes haplogrupos en poblaciones actuales de Europa y Próximo Oriente.

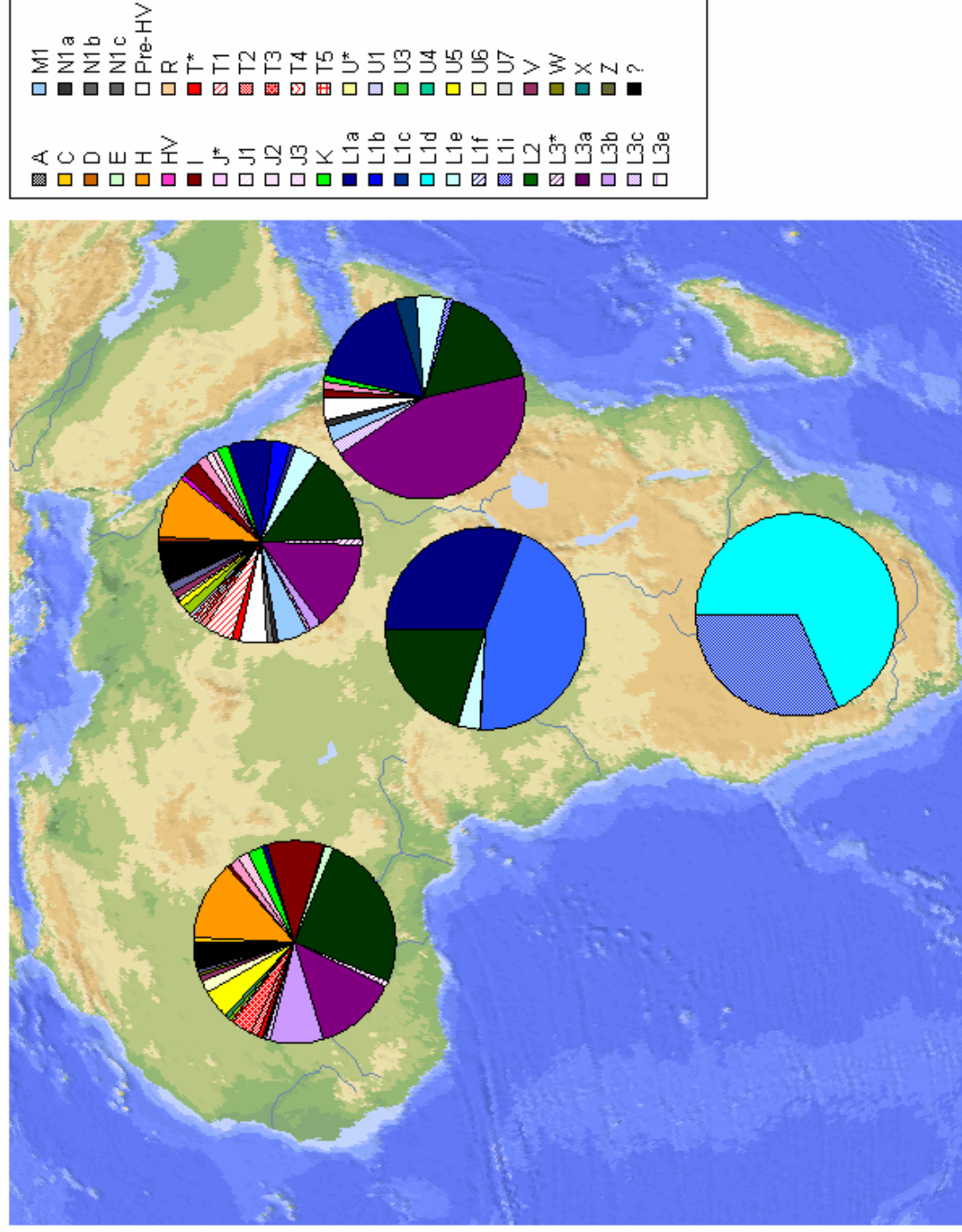


Figura FR73. Mapa de frecuencias de los diferentes haplogrupos en poblaciones actuales de África.

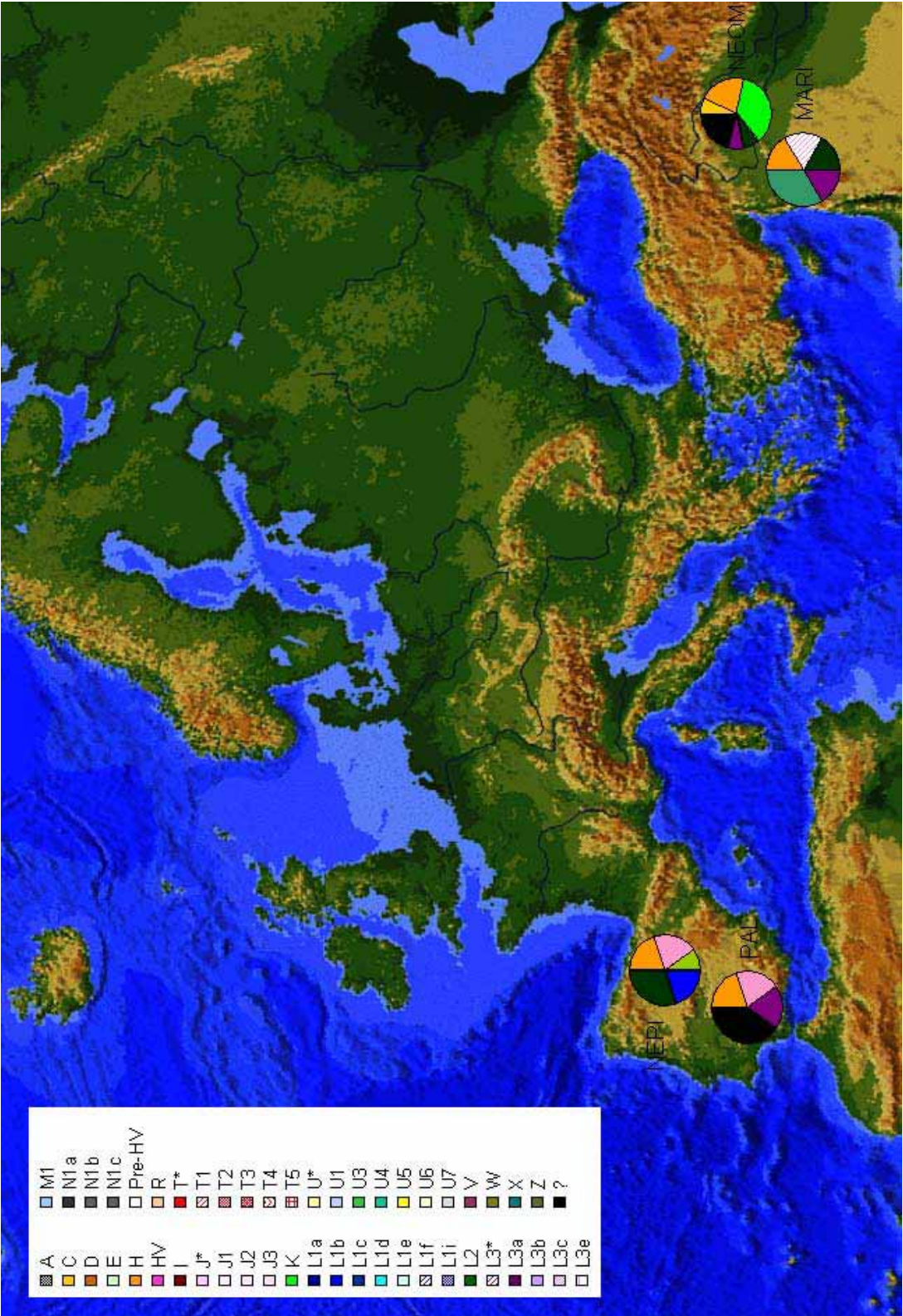


Figura FR74. Mapa de frecuencias de los diferentes haplogrupos en poblaciones antiguas de la Península Ibérica y Próximo Oriente.

En nuestra muestra antigua, formada por 35 secuencias completas, están representados cuatro de los nueve haplogrupos europeos más frecuentes: H, U, K y J. Los haplogrupos I y T no lo están, aunque este último pudiera incluir también las secuencias completas de DJ1 y H12 y la secuencia parcial de 1H24. En las cuatro poblaciones antiguas el **haplogrupo H** es uno de los más abundantes, aunque no el único, y su frecuencia ronda el 20%, como sucede también en las poblaciones actuales de Próximo Oriente.

En la población “Neolítico de Próximo Oriente” el **haplogrupo** mayoritario es el **K**, con un 30% de las líneas. La frecuencia de dicho haplogrupo en Europa actualmente es de un 4.51% y su distribución no es homogénea. Mientras que está ausente en algunas poblaciones como Suecia, País Vasco, Cataluña, Estonia, Laponia (Saami) y Suiza, presenta una frecuencia elevada en otras como Andalucía (20%), Bulgaria (12.90%) o Gran Bretaña (9.78%). En Próximo Oriente, el haplogrupo K actualmente presenta, en promedio, una frecuencia mayor (7.29%) aunque está ausente o en baja frecuencia en algunas poblaciones como Jordania y Turquía. En África, su frecuencia media ronda el 2% y no aparece ni en África del Sur ni en África Centro.

En la población de Mari el **haplogrupo** predominante es el **U4**. Este haplogrupo –presente en muy baja frecuencia en las poblaciones africanas y de Próximo Oriente actuales– se distribuye en Europa con frecuencia desigual. Los máximos se detectan en Cataluña (12.5%), entre los Karelios de Rusia (8.43%) y en Bulgaria (6.45%). En otras poblaciones como Suecia, País Vasco, Cataluña, Estonia, Laponia (Saami) y Suiza su frecuencia es igual a cero.

El **haplogrupo J** está presente en tres de las cuatro poblaciones antiguas (“Paleolítico”, “Neolítico de la Península Ibérica” y “Mari”) en frecuencia elevada. La frecuencia media de este haplogrupo en las poblaciones europeas es de un 7%. Sin embargo, alcanza una frecuencia mucho más elevada en algunas de ellas. Es el caso de Alemania (18.75%), Toscana (18%), Suiza (17.65%), Andalucía (13.33%) y Gran Bretaña (13.04%). Su frecuencia promedio es mayor en Próximo Oriente que en Europa, alcanzando valores muy elevados en ciertas poblaciones como Turquía (18.06%) y Jordania (25%), las cuales destacan, además, por presentar una elevada frecuencia del subcluster J1. Una línea inédita de este mismo subcluster está presente en

la población de Mari. En África el haplogrupo J está representado en el oeste y en el Valle del Nilo con una frecuencia también elevada y superior a la media de las poblaciones europeas (9.64%). Curiosamente, África del Oeste es la única población del conjunto total que reúne líneas del subcluster J3.

En la muestra antigua aparecen también representantes de los haplogrupos característicos hoy en día de África: L1b, L2 y L3a. El porcentaje de estas “líneas africanas” en las cuatro poblaciones antiguas es del 28.57%, si tenemos sólo en cuenta las secuencias completas y del 32.43% si consideramos también las secuencias parciales de los individuos AB14 y 2H31. Esta “contribución africana” es muy superior a la que presentan en promedio las poblaciones europeas y de Próximo Oriente actuales (1.65% y 3.64% respectivamente). Entre las poblaciones europeas con representantes de alguno de estos haplogrupos se encuentran Alemania (L3a), Canarias (L1b, L2 y L3a), Cerdeña (L2 y M1), Francia (L3a), Galicia (L3a y L3b), Toscana (L2), Albania (L1a), Andalucía (M1), Georgia (L2), Gran Bretaña (L3a), Grecia (L3a), Sicilia (L3a), Italia del Sur (L1b, L2, L3a), Noruega (L3b), Portugal (L3a), Rusia Norte del Cáucaso (L2, L3a) y Suiza (L3a). En Próximo Oriente las poblaciones de Israel (Drusos) (M1), Turquía (L1a, L3a) y Jordania (L1a, L2, L3a) incluyen asimismo linajes africanos.

El *haplogrupo L1b* aparece únicamente en dos secuencias de la población “Neolítico de la Península Ibérica”, lo que representa un porcentaje del 20%, valor superior al de las cinco poblaciones africanas actuales representadas en la base de datos.

El *haplogrupo L2* figura en dos de las cuatro poblaciones antiguas. En la población “Neolítico de la Península Ibérica” constituye el haplogrupo mayoritario, con una frecuencia del 30% si consideramos las secuencias completas y del 36.36% si incluimos la secuencia parcial de AB14. En la población “Neolítico de Próximo Oriente” este haplogrupo representa un 7.14% de las líneas, 13.3% si tenemos en cuenta también la secuencia parcial de 2H31. La frecuencia de este haplogrupo en la muestra antigua es muy superior a la de las poblaciones europeas y de Próximo Oriente y es muy similar al de las poblaciones africanas actuales.

Representantes del *haplogrupo L3a* se incluyen dentro de las poblaciones antiguas “Paleolítico”, “Neolítico de Próximo Oriente” y “Mari”. La frecuencia de este

haplogrupo en las poblaciones europeas y de Próximo Oriente es superior al de otros clusters africanos, aunque nunca excede al de las poblaciones antiguas. En África destaca su alta frecuencia en África del Este (44.05%), seguida por Valle del Nilo (14.17%) y África del Oeste (13.35%).

Finalmente, una secuencia de la población “Neolítico de Próximo Oriente” fue asignada al **haplogrupo C** asiático. Este haplogrupo, característico de Asia y América, es muy poco frecuente en nuestra base de datos de poblaciones actuales, y se encuentra representado sólo en las poblaciones de Georgia, Rusia Norte del Cáucaso, Canarias, Francia, Turquía y África del Oeste.