

Revista de Bioarqueología "ARCHAEOBIOS" N° 18, Vol. 1

Año 2023 ISSN – 1996 – 5214

ARCHAEOBIOS



REVISTA DE BIOARQUEOLOGÍA “ARCHAEOBIOS” N° 18 Vol. 2, Año 2023

DIRECTOR:

Víctor F. Vásquez Sánchez (ARQUEOBIOS, Trujillo-Perú)

COMITÉ EDITORIAL:

Teresa E. Rosales Tham (ARQUEOBIOS, Trujillo-Perú)

Gabriel Dorado Pérez (Universidad de Córdoba, España)

Isabel Rey Fraile (Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, España)

Carlos Rengifo Chunga (Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo-Perú)

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN:

Víctor F. Vásquez Sánchez (ARQUEOBIOS)

CARATULA:

Idea original: Víctor F. Vásquez Sánchez

Diseño electrónico: Milagros Vásquez Castañeda (Universidad Nacional de Trujillo)

INFORMACIÓN ADICIONAL:

Revista de Ciencias Aplicadas, Publicación Anual

Los artículos publicados en **ARCHAEOBIOS** son indizados o resumidos por:

- EBSCO Publishing (USA)
- CITEFACTOR (Directory of International Research Journals)
- CINECA (Comunidad científica italiana de supercomputación y herramientas de visualización científica)
- PROQUEST (Databases, EBooks and Technology for Research)
- LATINDEX (Sistema Regional de Información en línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal)
- Google Scholar
- DIALNET (Universidad de Rioja, España)

Derechos de Autor: los artículos firmados son de responsabilidad exclusiva de sus autores y no comprometen necesariamente el punto de vista de la revista. Reservados todos los derechos. Ni la totalidad, ni parte de esta revista puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación y sistema de recuperación, sin permiso escrito del editor.

Patrocinadores: La publicación de la revista **ARCHAEOBIOS** es financiada por el Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas.

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2007-07279

Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas

“ARQUEOBIOS

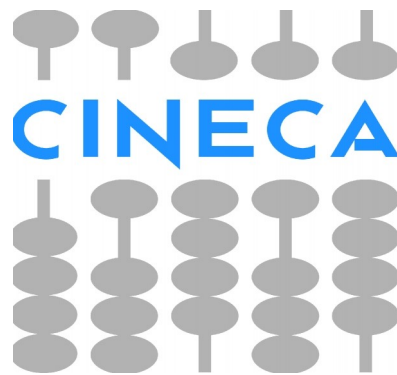
Apartado Postal 595, Trujillo, Perú

Teléfono: +51-44-949838067

URL: <http://www.arqueobios.org>

CARÁTULA: Mazorcas de maíz Chimú del sitio Manchan (Casma) encima de una vasija grande que tuvo evidencias de almidones de maíz y posiblemente utilizada para preparación y almacenamiento de *chicha*.

LA REVISTA "ARCHAEOBIOS ESTA INDEXADA EN:



CiteFactor
Academic Scientific Journals



Dialnet



CONTENIDO

Páginas

INTRODUCCIÓN

1

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Archaeological and contemporary native breeds of corn (*Zea mays*) from North Peru: phylogeny by microsatellite (STR) fingerprinting
Víctor F. Vásquez, José Arceo, Teresa E. Rosales, Klaus Koschmieder, José Luis Caballero and Gabriel Dorado 5

Razas nativas arqueológicas y contemporáneas de maíz (*Zea mays*) del norte del Perú: filogenia mediante toma de huellas dactilares por microsatélites (STR)
Víctor F. Vásquez, José Arceo, Teresa E. Rosales, Klaus Koschmieder, José Luis Caballero y Gabriel Dorado 34

Identification by histology of wooden implements from two coastal prehistoric sites in the Casma Valley, Peru
Shelia Pozorski, Teresa E. Rosales, Thomas Pozorski, Víctor F. Vásquez 62

Identificación mediante histología de implementos de madera de dos sitios prehistóricos costeros en el valle de Casma, Perú
Shelia Pozorski, Teresa E. Rosales, Thomas Pozorski, Víctor F. Vásquez 73

Evidencias de almidones de plantas cultivadas en sedimentos de cerámica doméstica de La Fortaleza, Kuélap-Departamento de Amazonas
Rosa M. Mayanga Cornejo y Teresa E. Rosales 85

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Archaeology and phylogeny to ascertain the evolution of amniotic egg and viviparity – Review
Gabriel Dorado, Fernando Luque, Francisco José Esteban, Plácido Pascual, Inmaculada Jiménez, Francisco Javier S. Sánchez-Cañete, Patricia Raya, Teresa E. Rosales, Víctor F. Vásquez, Pilar Hernández 103

Arqueología y filogenia para conocer la evolución del huevo amniótico y la viviparidad – Revisión <i>Gabriel Dorado, Fernando Luque, Francisco José Esteban, Plácido Pascual, Inmaculada Jiménez, Francisco Javier S. Sánchez-Cañete, Patricia Raya, Teresa E. Rosales, Víctor F. Vásquez, Pilar Hernández</i>	113
Caballo en América: Una breve crónica de su regreso <i>Claudia I. Alvarado León, Nicolas Delsol, Margarita Cossich Vielman</i>	124
El “caracol terrestre” <i>Scutalus sp.</i> en la iconografía mochica: El símbolo de la espiral y el ciclo del agua <i>César Gálvez Mora y María Andrea Runcio</i>	145
LIBROS PUBLICADOS Y POLÍTICA EDITORIAL	177

Introducción

Es el año 18 de la revista ARCHAEOBIOS, y ahora con la introducción de la Inteligencia Artificial (IA), hay ventajas y desventajas para la redacción de artículos científicos. Por un lado, han surgido diversas aplicaciones con IA para gestionar noticias de prensa, videos, libros y artículos científicos. Sin embargo, y como todo algoritmo, que es la técnica en que se fundamenta la IA, se puede rastrear y encontrar los fraudes, tal como han sido denunciados por varios grupos editoriales internacionales. La ventaja es que permite agilizar trabajos que anteriormente ocupaban tiempo y ahora son muy útiles. Con la entrada de la IA al mundo de la ciencia, no todo será positivo, porque van a desaparecer cuatro carreras profesionales, con la consecuencia de puestos de trabajo.

En nuestro país está novedosa técnica también esta incorporada en los teléfonos de tecnología Androide, lo cual resulta útil, pero también peligroso, según quién y para que lo utiliza. Las transacciones de dinero a través de los celulares con las diversas plataformas de enviar-recibir dinero y aquellas en donde tienes tus cuentas bancarias, son muy vulnerables si no conoces bien esta tecnología y no te asesoras bien de los peligros del *pishing*.

Desde febrero hasta octubre de este año, tuvimos los efectos de El Niño Costero, que ocasionó lluvias torrenciales en la costa norte del Perú entre marzo y abril (Tumbes, Piura, Lambayeque, Trujillo, Chimbote e inclusive Lima). La temperatura de la superficie del mar alcanzó temperaturas de 28° C en marzo, en la región 1+2 (influencia de El Niño Costero), que es la región del océano cercana a la línea litoral de la costa norte (Tumbes, Piura, Lambayeque y L Libertad), lo cual con el acople de la atmósfera por la temperatura alta del mar, origina lluvias torrenciales, que son suficientes para activar quebradas e inundar ciudades costeras, que no tienen infraestructura de drenajes para este tipo de lluvias e inundaciones. Todo este escenario climato-oceanográfico, altera el ecosistema y origina floraciones tardías y destrucción de cultivos, entre los más importantes, en esta región de la costa norte.

El Niño Global para poner todo en su contexto, es otro evento que se origina en la región 3+4 (ubicado en el pacífico central), y en los últimos Niños Globales de 1982-83 y 1997-98, que fueron los más potentes del siglo XX, en esta oportunidad se ha diluido y está en magnitud moderada, no tendrá influencia en la costa norte, y por lo tanto se diluirá en marzo de 2024.

Hay un factor muy peligroso de “personajes”, algunos profesionales de la especialidad y otros charlatanes, que han venido pronosticando lluvias destructivas desde Julio, inundaciones y destrucción, es decir un discurso apocalíptico, desde sus redes sociales, especialmente X (antes Twitter), periódicos, noticieros y entrevistas. Según mi criterio, tienen autodestrucción, ignorancia y deseos de sobresalir como los nuevos Nostradamus.

Las últimas noticias y el reforzamiento del Anticiclón del Pacífico Sur (APS) han permitido que la temperatura del mar se haya enfriado desde noviembre al presente. El APS por su sentido de movimiento como las agujas del reloj y el efecto Coriolis, han permitido arrastrar aguas frías subsuperficiales antárticas desde el sur hacia el norte, lo cual incluso ha enfriado de 26°C a 24°C el mar en el golfo de Guayaquil, disminuyendo las posibilidades de lluvias torrenciales en la costa ecuatoriana. En nuestro país, las temperaturas de la superficie del mar (TSM) por ejemplo en Paíta, han llegado a 17.8°C en fin de noviembre, modificando el clima continental.

Según los comunicados del ENFEN (Estudio Nacional del Fenómeno El Niño), el porcentaje posible de un Niño Costero Moderado en el verano 2024, es de 54%, siendo el restante Débil y Neutro (Comunicado Oficial ENFEN N° 20-2023) del 15 de diciembre. Estamos a mitad de diciembre el clima es benigno, no hay un calor excesivo en el día y las noches son frescas. Lo recomendable es consultar el ENFEN, la red X de especialistas confiables como Abraham Levy, AMBIAND y Sinóptica Sudamérica. Hay otros que incluso son profesionales con alto nivel académico, pero han ocasionado mucha confusión y ahora con las evidencias que los ponen al descubierto, no tienen otra alternativa que publicar lo evidente.

En este número se están publicando tres artículos de investigación y tres artículos de revisión. Del primero tenemos dos artículos en español e inglés y uno en español; en la sección de revisión, solo un artículo está publicado en ambos idiomas y los dos restantes solo en español. Esto tiene finalidad de alcanzar más público lector y otras regiones internacionales.

El primer artículo es sobre ADN de maíz Chimú y sus relaciones filogenéticas con razas modernas nativas alopátricas y simpátricas, relacionadas un grupo de ellas con las historias de maíz en esta época. Se utilizaron muestras antiguas de maíz de la época Chimú del complejo arqueológico El Brujo (valle de Chicama) y del sitio arqueológico Puerto Pobre (valle de Casma). Una fase de los análisis del ADN de maíz arqueológico y moderno se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Chapingo (Texcoco-México) y los laboratorios de Biotecnología del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, Int., Texcoco-México). Como se trataba de análisis de ADN antiguo, que tiene como requisito importante que los primeros resultados obtenidos se puedan repetir en otro laboratorio, esta fase se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, donde se confirmaron los primeros resultados obtenidos en México.

Los resultados obtenidos indicaron que las muestras arqueológicas de ambos sitios (El Brujo y Puerto Pobre) fueron monomórficas, es decir genéticamente similares, lo cual es muy interesante para la historia del maíz de esta época, que se puede explicar con hipótesis históricas, de relaciones de comercio entre sitios Chimú, y en el caso de la introducción de la raza de maíz Cusco, cuando los incas conquistan a los chimú, pero no hay ningún indicador genético de que haya sucedido una fuerte introgresión genética. Por el contrario, muy cercanas a las razas nativas modernas

de la costa norte como Mochero, Alazán y Pagaladroga. Los resultados de esta investigación se realizaron entre 2002 y 2006, y merecían que los lectores interesados en el tema, lo conozcan.

Los implementos de madera que a menudo recuperan los arqueólogos no son estudiados, salvo su morfología, medidas, descripciones generales, pero casi nunca se identifica a partir de que árbol se utiliza la madera para la elaboración de estos implementos. La identificación taxonómica de la madera de estos artefactos, es muy importante porque permite añadir información etnobotánica de la especie que la cual se utiliza la madera, y por lo tanto conocer no solo la tecnología de fabricación, sino también que propiedades de la planta, son conocidas y utilizadas recurrentemente en la prehistoria de la costa peruana.

Varios implementos de madera, especialmente iniciadores de fuego (la base y la varilla de fricción) se han recuperado de las excavaciones en Bahía Seca y Huaynuná, excavados por Thomas Pozorski y Shelia Pozorski en la década de 1980. La identificación taxonómica de estos implementos de madera indica que fueron fabricados a partir de *Prosopis sp.* "algarrobo", utilizando ramas secundarias gruesas y delgadas. La característica de tener una madera resinosa, ha influido para su uso en la generación y obtención de fuego, una tecnología que empieza a conocerse a partir de este estudio.

Los residuos de almidón en el interior de fragmentos de vasijas, son evidencias que permiten registrar evidencias microbotánicas, cuando la evidencia macro está ausente por cuestiones de conservación, como es el caso de sitios arqueológicos en los andes. La arqueóloga Rosa Mayanga y Teresa Rosales, han analizado una muestra de 17 fragmentos de cerámica del sitio la Fortaleza en Kuélap. Los análisis microscópicos indicaron la presencia de *Zea mays* y *Manihot esculenta*. Por la altitud del sitio (3000 msnm) es posible que el maíz estuvo accesible en los alrededores del sitio y la yuca que crece hasta 2500 msnm, debió ser importada desde valles interandinos o la parte baja del lado oriental. La utilización de estos almidones de estas plantas, indican que fueron consumidos en festines de ceremonias que se habrían registrado en el sitio. Esta información obtenida debe ser realizada con fragmentos de cerámica de diversos sitios andinos o de la selva, para abrir una cronología de la utilización de plantas según diversos sitios.

En la sección de artículos de revisión, tenemos tres artículos, el primero es del grupo del Dr. Gabriel Dorado, sobre la evolución del huevo y la viviparidad. Se discute el modelo de la Retención Embrionaria Extendida, donde en un primer paso evolutivo los antiguos reptiles, aves y mamíferos eran vivíparos, posteriormente algunos de ellos desarrollaron la oviparidad, con la aparición de finas capas de tejidos, que dio lugar a los amniotas (en el Carbonífero, hace aproximadamente 300 millones de años). Hoy se conoce que reptiles vivos como cocodrilos y tortugas y aves muestran oviparidad sin REE, pero hay una mayoría de lagartos, serpientes y mamíferos que presentan oviparidad con REE o viviparidad. Este debate interesante será aclarado en el futuro por la arqueología y la biología molecular.

Un sugerente artículo sobre el caballo en América nos lleva a conocer los orígenes americanos del caballo desde el Eoceno, y su desaparición entre el Pleistoceno y Holoceno, que fue su migración hacia el viejo mundo. Luego su regreso a América a finales del siglo XV e inicios del XVI. En este artículo los autores describen los primeros testimonios sobre el caballo y su llegada a la Hispaniola (isla soberana entre Haití y Santo Domingo), abordando los medios en que fueron representados, significados y evidencias zooarqueológicas en contexto coloniales, tratando de explicar esta nueva relación con los nativos americanos de una nueva especie a estos territorios.

El último artículo es un tema interesante sobre el caracol terrestre *Scutalus spp.* su representación y significado en la iconografía mochica. Con información etnográfica, ambiental e iconográfica, se aborda su significado ritual de carácter funerario, asociando las representaciones de este pulmonado terrestre en la cerámica mochica, mostrando escenas de recolección, de combate y del sacrificio de la montaña. Los autores proponen que las representaciones de caracoles pueden ser ubicadas en los solsticios de verano e invierno, y excepcionalmente en eventos El Niño. También lo asocian con el agua y la regeneración, y su morfología en forma espiral de la concha, ven replicados en modelos arquitectónicos en rampa con espiral.

Esperamos que las contribuciones en este nuevo número de ARCHAEOBIOS, sean útiles a los lectores tanto para aumentar sus conocimientos y les sirva para complementar sus investigaciones, siempre tratamos de difundir lo mejor de los conocimientos que se utilizan en bioarqueología.

La Dirección



ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Archaeological and contemporary native breeds of corn (*Zea mays*) from North Peru: phylogeny by microsatellite (STR) fingerprinting

Víctor Vásquez¹, José Arceo[†], Teresa Rosales², Klaus Koschmieder^{††}, José Luis Caballero³ and Gabriel Dorado⁴

¹Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas, ARQUEOBIOS, C/ Martínez de Compañón 430-Bajo 100, Urbanización San Andrés, 130008 Trujillo (Perú)Trujillo, Perú; [†]Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Autónoma Chapingo, México; ²Laboratorio de Arqueobiología, Avda. Juan Pablo II s/n, Universidad Nacional de Trujillo, 13001 Trujillo (Perú); ^{††}Freie Universität Berlin, Alemania; ^{3,4}Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, España

Abstract

Microsatellites were used to evaluate and compare the lineage relationships and genetic diversity of two improved cultivars of corn (*Zea mays* L.), seven modern native races, and eight archaeological Chimú samples (1.100-1.500 AD) of the North Peruvian coast. Electrophoresis was required to remove the PCR inhibitors from ancient DNA. Eight STR primer pairs generated amplicons from the genome of modern corn, but only five amplified ancient corn DNA. To establish the lineage relationships among samples, the coefficient of similarity of Jaccard and the technique of analysis of conglomerate with binding average were used. Thus, the pattern of genealogical and genetic relationships of the genotypes were determined. Seven out of the eight pairs of SSR primers revealed polymorphism, being 2.47 (range 2-6) the average of polymorphic alleles. The total alleles tested were 23, with 97 polymorphic bands for the modern corn, yet being monomorphic for the Chimú corn, generating an average of genetic similarity of 0.44 and 1, respectively. These results suggest the existence of inbreeding in some populations of Chimú corn of the north coast of Peru 500 to 900 years ago. Modern races exhibited higher polymorphism, due to hybridization and better assisted selection, in agreement with cytogenetic data.

Key words: dendrogram, molecular markers, short tandem repeats, single sequence repeats, taphonomic history, UPGMA

Resumen

Se utilizaron microsatélites para evaluar y comparar las relaciones de linaje y la diversidad genética de dos cultivares mejorados de maíz (*Zea mays* L.), siete razas nativas modernas y ocho muestras arqueológicas Chimú (1100-1500 d.C.) de la costa norte peruana. Se requirió electroforesis para eliminar los inhibidores de la PCR del ADN antiguo. Ocho pares de cebadores STR generaron amplicones del genoma del maíz moderno, pero sólo cinco amplificaron el ADN del maíz antiguo. Para establecer las relaciones de linaje entre muestras se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard y la técnica de análisis de conglomerado con promedio de unión. Así, se determinó el patrón de relaciones genealógicas y genéticas de los genotipos. Siete de los ocho pares de cebadores SSR revelaron polimorfismo, siendo 2,47 (rango 2-6) el promedio de alelos polimórficos. El total de alelos probados fue 23, con 97 bandas polimórficas para el maíz moderno, pero monomórficas para el maíz Chimú, generando un promedio de similitud genética de 0,44 y 1, respectivamente. Estos resultados sugieren la existencia de endogamia en algunas poblaciones de maíz Chimú de la costa norte del Perú hace 500 a 900 años. Las razas modernas exhibieron un mayor polimorfismo, debido a la hibridación y a una mejor selección asistida, de acuerdo con los datos citogenéticos.

Palabras clave: dendrograma, marcadores moleculares, repeticiones cortas en tándem, repeticiones de secuencia única, historia tafonómica, UPGMA

Introduction

The corn (*Zea mays* L.) is the third world crop in economic importance after the wheat (*Triticum aestivum* L.) and the rice (*Oryza sativa* L.). Archaeological records of maize date back 7.000 years. The corn originated in the American continent from wild species (“teocintles” or “teosintes”), which had a very different appearance than modern corn, propagating into South America before the Spanish conquest. It is currently accepted that the maize domestication was accomplished through the selection of regulatory elements of the gene *teosinte brancheli* (*tbi*). Actually, the variation in the coding region of the gene is similar in modern maize and teosinte (Wang et al, 1999). The process generated new maize breeds with short branches tipped with ears rather than long branches with tassels at the tip. It is believed that such traits became fixed during hundreds of years of human selection together with introgressions after accidental back crossings of cultivated breeds with wild teosinte specimens (Henry, 2001).

Several archaeological evidences suggest that the corn was grown independently in Peru, which shows a large number of breeds. This fact has been considered to propose Peru as an independent domestication center (Grobman et al, 1961; Bonavía and Grobman, 1978). Yet, the absence of the wild prototypes *Zea mexicana*, *Z. diploperennis* and *Z. perennis* (the teosintes or wild relatives of corn), which are only found in Meso America and Central America, spell doubts on the independent domestication of corn in South America. Therefore, it is currently accepted that Peru was instead a secondary diversity center (Hawkes, 1991).

So far, 132 breeds of corn have been described in the Andean region. Up to 55 of them have been considered typical Peruvian, defined after morphological and cytogenetic characters (Grobman et al, 1961). The description of such breeds is rather complicated due to the lack of a clear differentiation between some of them. This is a consequence of the continuous genetic recombination, together with mutations, hybridations and lack of geographical isolation which prevent genotype fixation. These factors have contributed to the large genetic variation found in this crop, which has been analyzed at two levels: archaeobotanical (Yacovleff and Herrera, 1934; Grobman et al, 1961; Towle, 1961; Galinat, 1970; Bird, 1978, 1980, 1985, 1989, 1990, 1994; Dunn, 1979; Bird and Bird, 1980; Bonavía, 1982) and evolutive (Harlan, 1971; Bonavía and Grobman, 1978; Bird, 1979, 1980, 1990; Pearsall, 1986; Engel, 1987).

The climatic conditions of the Peruvian coast (one of the driest deserts in the world) has favored the preservation of large quantities of archaeological remains of corn (shoots, dry leaves, seeds and even full cobs). This has allowed the development of a large number of studies about the early farming of this crop in the prehistory of the Peruvian coast. Nevertheless, the systematic studies to know the evolutive and genetic-molecular aspects of

ancient corn are scarce. Such kind of knowledge is very interesting, since it would allow to determine the molecular diversity fingerprints and patterns in ancient corn. Furthermore, the comparison of molecular data between ancient and modern breeds will shed new light to explain the genetic relationships and evolution patterns along the corn domestication and breeding history.

A particularly important aspect of the analysis of the corn archaeological specimens is the establishment of their racial identity. This has been accomplished in the past based only on morphological aspects of both the corncobs (size, shape, number of strings, seeds per string, etc.) and the seeds (shape, color, etc.). Yet, these traits can be modified by the prevalent environment conditions during plant farming and preservation, including ambient humidity, compression and fragmentation. All these factors, together with the human handling may hinder a proper identification.

Fortunately, the DNA fingerprinting technologies can be exploited to properly identify and classify the archaeological corn samples. DNA-based genotyping is in fact a valuable new approach to determine the identity, evolution and phylogeny (Doebley, 1994). Thus, high molecular weight DNA (1.5 - 2.0 kbp) isolation from deseeded corncobs 4700 ± 500 years old from Peru and Chile has been reported. This allowed allelic comparisons for a fragment of the *adh₂* gene in three archaeological specimens, four *teocintle* types and four modern corn breeds. Some old alleles of the *adh₂* gene were identical or closely related with modern corn alleles. These findings pointed three issues: that the corn genome is very old indeed, that there was a domestication process previous to the South American introduction, and finally the development of the modern corn breeds from wild populations (Goloubinoff et al, 1993).

Another DNA-based study on archaeological corn from Peru was carried out with nine well-preserved cobs retrieved from a burial of the Wari culture (600-850 years AD). They were tentatively classified as 'Proto-Pagaladroga' since the radio-carbon dating assigned them 980 ± 95 years (with reference to year 1.950). The nucleic acids were extracted from the seeds using phenol and segregated by on 2.5% (w/v) agarose gel electrophoresis fractioning. The isolated material showed a low molecular weight. These results were further confirmed by radioactive ATP labeling and 8% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis. The sequencing of the amplified DNA showed differences when compared to modern corn. This represents the first evidence clearly demonstrating that the seeds of Wari corn contain endogenous DNA (Rollo et al, 1994a).

It has also been reported the isolation of high molecular weight DNA (up to 20 kbp) from the 'Anazasi' North American native archaeological corn from the XII century. This allowed the application of the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) methodology and thus allelic comparisons between archaeological and modern corns (Helentjaris, 1988). Yet, although the author demonstrated that enough quantity of good quality DNA can be extracted

from archaeological cobs for RFLP analysis, the small number of probes tested did not allow a phylogenetic analysis.

Previous work has reported comparisons of Chimú corn with modern breeds from the north coast of Peru using molecular tools like Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) at the “Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo” (CIMMYT, Mexico). The DNA was extracted from a total of 22 archaeological samples. The RAPD CIMMYT procedure allowed the amplification of four native archaeological samples, three modern highlander breeds and one Panamanian cultivar. The primers used generated small DNA amplicons (usually about 70 to 220 bp), yet no phylogenetic relationships could be established due to the small number of alleles compared (Bird et al, 1995b)

On the other hand, the archaeological patterns predict that the ‘Cuzco’ breed could be more related to the Chimú corn than to the other breeds which are more geographically proximate (Bird et al, 1995b).

The purpose of the present work was to overcome the classification methods based on morphological traits to establish the racial identity and diversity of the archaeological corn remains and their kinship links. To that goal we have used the DNA-based methodology of microsatellites, also known as Short Tandem Repeats (STR) or Single Sequences Repeats (SSRs). This procedure will allow to decipher the genetic relationships between the Chimú corn and the modern breeds of the North Peruvian coast. Additionally, we wanted to evaluate the hypothesis of a hybridization between Northern (‘Alazán’, ‘Pagaladroga’, ‘Mochero’ and ‘Arizona’) and Southern (‘Huayleño’, ‘Paro’ and ‘Cuzco’) corn breeds when the Chimú culture was conquered by the Incas (Southern Mountain range), which likely produced a corn germplasm interchange.

Materials and methods

Archaeological corn collections

The archaeobotanical samples of corn (*Zea mays* L.) were discovered in two archaeological projects currently running in the North Peruvian coast. An important quantity of ancient corn remains related to the Chimú culture (1.100–1.500 AD) was recovered from them. Sampled sites included the Archaeological Complexes of ‘El Brujo’ (Department of La Libertad), particularly for houses; and ‘Puerto Pobre’ (Department of Ancash) (Fig. 1), for both houses and garbage dumps. The ‘El Brujo’ collection was made of two well-preserved samples: T1 and T4, including 45 and 28 isolated seeds, respectively. The ‘Puerto Pobre’ collection was made of six full-cob samples (Fig. 2): 3-513-PP, 4-518-PP, 5-519-PP, 6-520-PP, 7-525-PP and 8-526-PP. An average sample of 40 seeds were chosen from the central portion of the

cob, where best preserved alleles are expected. Appropriate authorizations were obtained from the “Instituto Nacional de Cultura” (Peru) for the corresponding exportations and studies of DNA markers (Mexico), Scanning Electronic Microscopy (SEM) (Spain) and radiocarbon dating (Denmark and USA), taking into account the original cultural scenarios.



Figure 1. **Archaeological sites.** Geographical situation of the main archaeological corn (*Zea mays*) remains in the Peruvian coast.

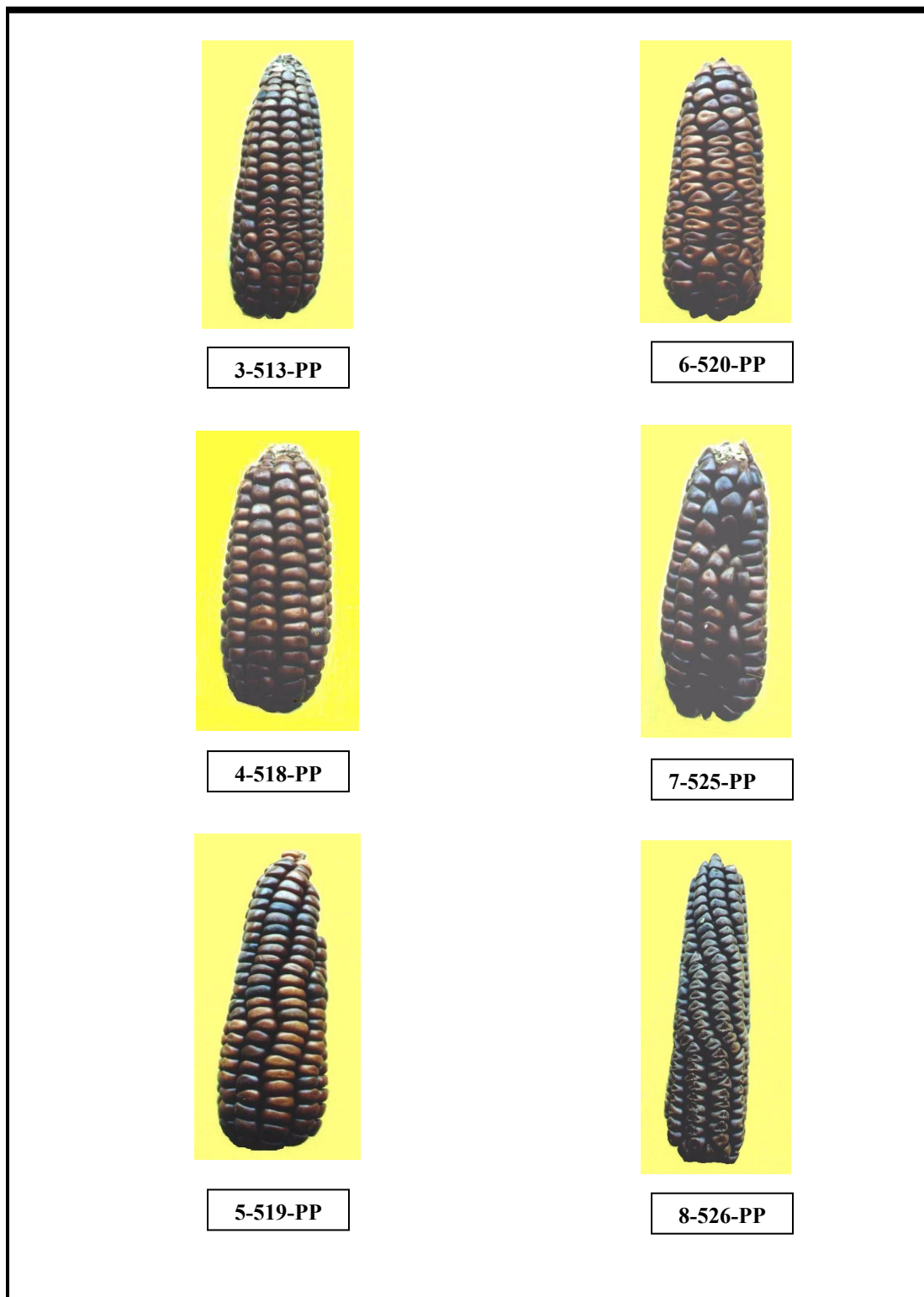


Figure 2. Collections of archaeological Chimú corn (*Zea mays*).

Modern samples: selection and sowing of corn breeds

We have used seven native breeds of Peruvian corn (Table 1) and two improved cultivars generated at the CIMMYT. The samples from Peru included 'Alazán', 'Pagaladroga', 'Mochero' (primary breeds) and 'Arizona' (secondary breed), cultivated in the Northern coast; 'Huayleño' (primary breed) from the Ancash Mountain range; and 'Paro' and 'Cuzco' (primary breeds) from the Southern range. Finally, the CIMMYT samples (CML123 and K64R) had known genealogies and were thus used as positive controls.

Table 1. Native modern breeds of corn (*Zea mays* L.) from Peru analyzed in this work.

Sorting number	Accession number	Pedigree	Breed (acronym)	Altitude ¹ (m.o.s.l.)	Place of origin (reference)
1	8955	Perú 585	Alazán (ALA)	55	Lambayeque (74-440-0)
2	15454	Perú 752	Huayleño (HUA)	2600	Chiclayo (Q95-87)
3	8917	Perú 382	Paladroga (PAG)	55	Lambayeque (76-80-0)
4	13526	Perú 526	Cuzco (CUZ)	–	Chiclayo (Q94)
5	–	–	Paro (PAR)	–	Chiclayo (Q98)
6	–	–	Mochero (MO)	50	Macabi
7	–	–	Arizona (ARI)	50	Trujillo

¹Meters over the sea level (m.o.s.l.)

The modern seeds were obtained from the Corn Germplasm Bank of the CIMMYT and sown in 50 cm tall flowerpots containing a mixture substrate decontaminated with methyl bromide and made of equal amounts of sand, soil and manure. Three weeks after the germination of the seeds in the greenhouse, 4 g of young and healthy leaf tissue were excised from each plant. To increase the variability of the samples, three plants were analyzed for each breed. The leaves were chopped with sterile scissors and washed with 70% (v/v) ethanol to remove any remains of dirt or microorganisms like bacteria and fungi.

Laboratory tests

The radiocarbon dating was carried out at the Geology Laboratory of Copenhagen (Denmark) and the Beta Analytic Radiocarbon laboratories at Florida (USA) for the samples from 'El Brujo' and 'Puerto Pobre', respectively. The scanning electronic microscope inspections of the archaeological corn seeds were performed at the Laboratories of Electronic Microscopy of the "Universidad Autónoma de Madrid" (Spain). The genomic DNA extraction was carried out in the Molecular Biology Laboratory of the "Universidad Autónoma Chapingo" (Mexico). The STR tests were performed in the Applied Molecular Genetics Laboratory of the CIMMYT (Mexico), following the procedures described in the Laboratory Protocol Manuals (Hoisington et al, 1998).

Genomic DNA isolation from archaeological and modern corn

The extraction of the genomic DNA from the modern breed leaves (2.5 g) and from the archaeological seeds (5 g) was accomplished after the Dellaporta method (Dellaporta *et al.*, 1983) with some modifications. Briefly, it included four steps: i) extraction with phenol to obtain high purity DNA; ii) electrophoresis in low melting point agarose (archaeological samples) from BDH Laboratory Supplies (Poole, UK; www.bdh.com) to discard PCR inhibitors after Sambrook and Russell (2001); iii) precipitation with cold (4° C) absolute ethanol in the case of modern breeds or after recovery from agarose plugs for archaeological samples (melting at 65° C, addition of one volume of TE buffer, pH 8.0 and incubation at 65° C, addition of one volume of equilibrated phenol, centrifugation, recovery of the aqueous phase, and precipitation with absolute ethanol); and iv) three 70% (v/v) ethanol washes (archaeological samples) to further clean the isolated DNA. The DNA was quantitated reading the optical density at 260 nm in a DU-65 spectrophotometer from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA; www.beckmancoulter.com). The DNA samples were stored at 4° C and diluted to 100 ng/μl or 125 ng/μl before their use.

PCR amplification of the STR molecular markers

The STR typing was carried out after PCR amplification, size fractioning and staining (Hoisington *et al.*, 1998), as described below. Eight pairs of PCR primers were chosen, based on their higher polymorphism and location in the corn genome (Table 2).

Table 2. Microsatellite markers tested on seven native Peruvian breeds, two improved cultivars and eight archaeological samples of corn (*Zea mays* L.).

Marker	Loci name	Allele size (bp)	PCR (°C)	Repetition pattern (5' => 3')	Forward and reverse primers (5' => 3')
	<i>bnlg1</i>	< 118	54	(AG) ₁₇	CTCTGCGCTACCTTTCTGAGTC GCGGAATCCTTGTGTTCTTG
	<i>dup0</i>	118-19	58	(CT) ₃ T (CT) ₆ (CA)	AGCAGGTACCACAATGGAG GTGTACATCAAGGTCCAGATTT
	<i>phi01</i>	110-12	54	GGA	GAGCTTCAGCAAGAGCATCCAG CAACGCGATCGATGTGAGCACA
	<i>phi04</i>	62-66	54	ACGC	ATCTCGCGAACGTGTGCAGATTCT TCGATCTTTCCCGGAAGTCTGAC
	<i>phi07</i>	156-16	54	GAGCGG	TTCTTCCGCGGCTTCAATTTGACC GCATCAGGACCCGCAGAGTC
	<i>phi11</i>	120-28	58	GTCT	GCTCCAGGTCGGAGATGTGA CACAAACACATCCAGTGACCAGAGT
	<i>phi11</i>	93-113	58	TA-ATAC	CTAGTGGGCGAACAAGTGGTAAG AAAGAGACCGTGTGAGGATTGCC
	<i>phi12</i>	100-12	58	AAGCG	TTGCTCGGTATGAAGAAAATAGTCT ATCTTGCAACTAGACTGAGGCAACC

The PCR mixture used to amplify the archaeological/modern (respectively) corn DNA contained the following components in a total of 20 µl reaction volume per tube: 125/50 ng of DNA, 1X PCR buffer solution for the *Taq* DNA polymerase enzyme, 5.0/3.5 mM MgCl₂, 150 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 2.0/1.5 U of the *Taq* DNA polymerase enzyme from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA; www.invitrogen.com), 10% (v/v) glycerol and 0.25 µM of each (forward and reverse) corn-specific primer from Primer Research Genetics (Huntsville, AL, USA; www.primerresearch.com). The amplification was accomplished in a Thermal Cycler 480 from Applied Biosystem (Foster City, CA, USA; www.appliedbiosystems.com) with the following cycling profile: one first denaturing step (1 min at 93° C); 35 cycles (1 min denaturing at 93° C, 2 min annealing at “X” °C, and 2 min extension at 72° C); and one final step (7 min at 72° C) to help finish incomplete amplicons. The “X” represents the specific hybridization temperature used for each pair of STR primers, in a 54° C to 58° C range (see Table 2), being selected with the thermal intervals of the Maize Data Base (MaizeDB) at <<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>>.

The amplicon segregation was accomplished in 3% (w/v) Seakem agarose gels from BMA (Rockland, MD, USA; www.bmaproducts.com) for the preliminary tests and then in 12% (w/v) denaturing polyacrylamide gels (13 cm tall x 14 cm wide x 1 mm thick). Independent gels were used for each STR marker. Aliquots of 4.5 µl of each PCR product were placed on the gel wells made with 28-tooth combs. Three wells per gel were reserved for molecular weight

standards: '*phiX174/HaeIII*' for the first and last wells, and '100 bp DNA ladder' from Invitrogen between the archaeological (left side samples: T1, T4, 513, 518, 519, 520, 525 and 526) and modern (right side samples: Alazán, Arizona, Mochero, Pagaladroga, Huayleño, Paro, Cuzco, CML131 and K64R) corns. The separation was performed in AE-6220 vertical electrophoresis systems from Atto Corporation (Tokyo, Japan; www.atto.com). The gel electrophoresis was run at 300 V and 95 mA (28.5 W) for 3 h.

The DNA amplicons were visualized after 0.2% (w/v) silver nitrate staining. The STR alleles were visually scored based on their molecular sizes. The developed gels were documented with a Digital Science 1D camera from Kodak (Rochester, NY, USA; www.kodak.com) under visible light.

Statistical procedures

Data analysis was based on the DNA band (allele) scoring on the gels (presence or absence of particular bands in the gel photographs). The alleles obtained in the different amplification replicas were compared, confirming their expected sizes with the molecular weight standards included in the gels. The analyses were very restrictive. Therefore, only clear and consistent bands showing the expected sizes (electrophoretic mobility) through all repetitions and gels were considered as equivalent and thus scored. The gel bands corresponding to the STR amplicons were input in a Basic binary Data Matrix (BDM) for both archaeological and modern corn samples. This was accomplished using the spreadsheet Excel from Microsoft (Redmond, WA, USA; www.microsoft.com), scoring zero ("0") when the band was absent, one ("1") when it was present, and a question mark ("?") when it was doubtful. The BDMs were then transformed in similarity matrices applying the Jaccard's Similarity Coefficient: $a/(n-d)$; being "a" the number of DNA fragments (gel bands) shared between two genotypes; "n" the total number of polymorphic bands found after the gel screening, and "d" the number of missing bands in both genotypes (Jaccard, 1908). This generated a matrix made of zeros and ones for each primer pair used in the PCR amplifications. The columns represent the samples analyzed and the rows correspond to the bands (alleles) selected in the molecular weight range expected for the selected STR primers. The different matrices obtained for each primer pair were joined to build a single one, which was then analyzed using the application NTedit version 1.1b (1998) from Applied Biostatistics (Foster City, CA, USA; www.appliedbiostatistics.com). The matrix of zeros and ones was exported to the application NTSYSpc version 2.02i (1998) from the same manufacturer and further transformed in a genetic similarity matrix. The pattern of genotype relationships for the molecular marker matrix was obtained applying the procedure of conglomerate analysis based on the Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average (UPGMA). Finally, the dendrogram showing the phylogenetic relationships was built. The data were processed with the applications NTSYSpc (Rohlf 1997) and Excel.

Results

Radiocarbon dating of archaeological collections

The antiquity (authenticity) of the ancient Chimú corn collections and therefore the DNA isolated from them was confirmed with radiocarbon dating of representative samples from each emplacement. Thus, a sample corresponding to the 'El Brujo' (from 'Huaca Cao Viejo') was analyzed in the Geology Laboratories of the National Museum of Denmark. The expected age was 590 ± 70 years (relative to the year 1950). The dating showed figures between 1.300 to 1.420 years AD; that is 640 years ago, considering the year 1.360 AD as average.

Another sample from 'Puerto Pobre' was dated at the Beta Analytic Radiocarbon Laboratories of Miami. The expected age was 440 ± 50 years (relative to the year 1950). The calibration with 2 sigma showed dates between 1415 to 1520 years AD with 95% probability; that is, about 530 years ago, considering the year 1470 AD as average.

Scanning electronic microscope topography of ancient Chimú corn seeds

The photographs corresponding to sample 518 from 'Puerto Pobre' show a clean reticulated look of the seed head. There is also a large quantity of starch grains from the endosperm, with some proteic bodies typical of this species (Fig. 3). The magnification is 1000X, showing a good preservation and the absence of microorganisms, which supports the endogenous nature of the isolated DNA.

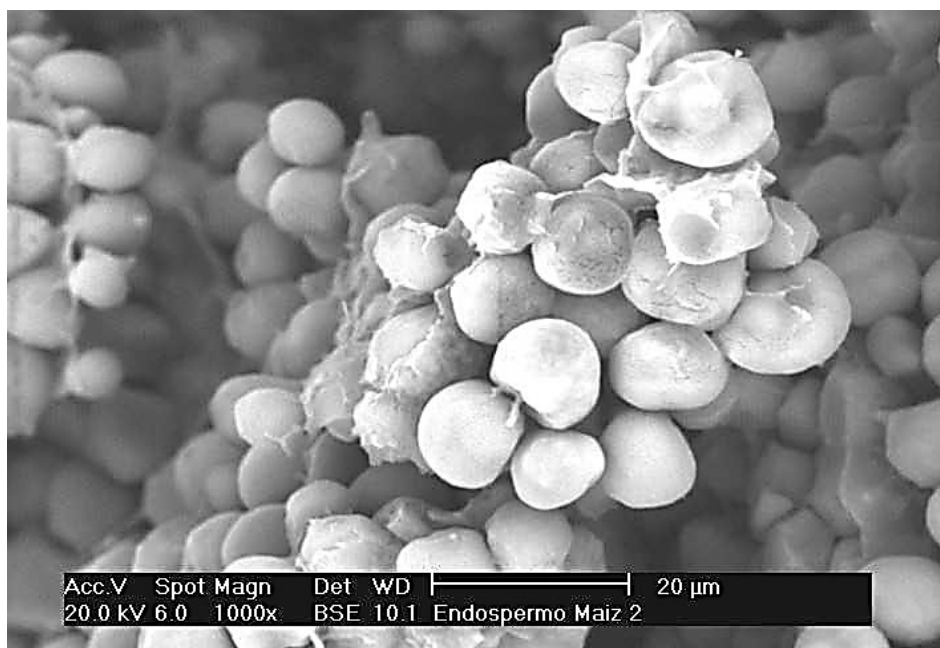


Figure 3. **Scanning electron microscopy.** Endosperm topography of archaeological Chimú corn (*Zea mays*) seeds. Samples were vacuum-stained with gold and amplified 1,000X.

Isolation of genomic DNA from the archaeological corn samples

The DNA was isolated from leaves (modern breeds) or from seeds (archaeological corn). The latter showed good band signals of 70 to 500 bp on 2% (w/v) agarose gels stained with ethidium bromide after UV illumination (Fig. 4).

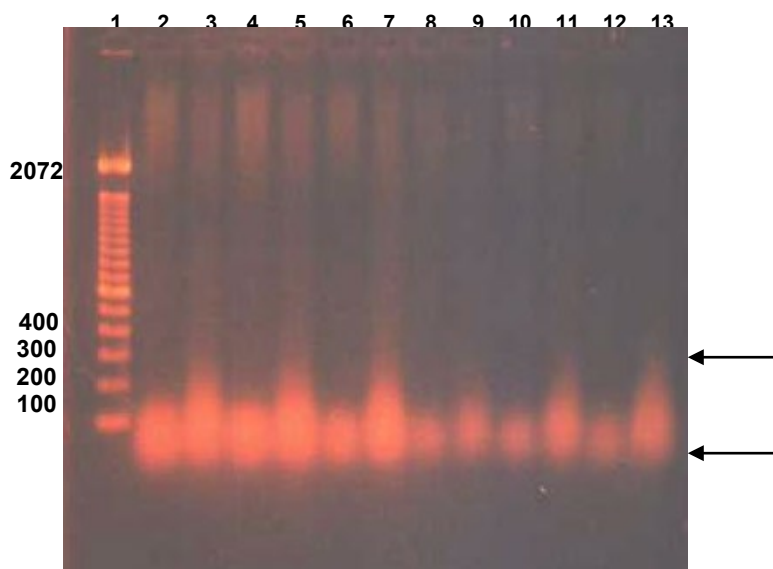


Figure 4. **Total nucleic acids from archaeological Chimú corn (*Zea mays*) collections.** Samples were loaded on 2% (w/v) agarose gels and photographed under UV. light after ethidium bromide staining. Lane 1: “1,000 bp ladder” molecular weight marker; lanes 2 to 7: ‘Puerto Pobre’ corn samples; Lanes 8 to 13: ‘El Brujo’ samples.

Yet, old corn DNA contained many impurities (salts, tannins, humic acids, etc.). Contaminants were effectively removed segregating the PCR reaction product by electrophoresis (like the low melting point agarose approach described in this work) and excising the amplified DNA band of interest. The brownish contaminants (tannins and humic acids) exhibited a slower migration than the partially degraded DNA and RNA molecules. After ultra violet (UV) light irradiation, such contaminants produced a green-bluish fluorescent blotch, clearly different and segregated from the orange-reddish fluorescence of the DNA. The latter was selected, excised, melted and subjected to DNA re-extraction. The newly purified and quantified material was diluted and used in the subsequent PCR reactions, which amplified the STR targets. Not surprisingly, the concentration data from the re-extracted DNA (old genotypes) revealed that the quantity and quality of ancient DNA that could be isolated from each sample was directly associated with the preservation grade of the seeds (the better preservation of the seeds, the more and better DNA that could be retrieved from them).

STR typing

Different experimental conditions were tested to optimize the STR amplifications by PCR. For instance, it was found that the amplification of ancient corn DNA required higher concentrations of MgCl₂ and Taq DNA polymerase than the ones needed for modern samples. Interestingly, such concentrations were also somewhat higher than the ones previously reported for modern corn DNA by Hoisington et al, (1998). On the other hand, the optimal annealing temperatures found in this work (54° C and 58° C) for the eight pairs of primers are in agreement with the published data in 'MaizeDB', except for the primer pair *bnlg131*. The latter amplified Alazán, CML and K64R, yet failed to properly amplify the other modern genotypes with a clear and consistent pattern, being thus scored as a question mark ("?) in the matrix data (BDM). It must be pointed out that we did not test lower temperatures, which might have generated positive results for such primer pair.

Five (*dup014*, *phi046*, *phi128*, *phi113* and *phi115*) out of the eight pairs of STR primer pairs tested usually generated DNA fragments (alleles) with good resolution in both old and modern samples. The only exceptions were *dup014* (which amplified Alazán but did not generate unambiguous bands with the other modern genotypes), and *bnlg131* (as previously indicated), *phi011* and *phi076* (which did not produce any amplified DNA from archaeological samples). The eight STR markers generated 23 total alleles, being nine of them present in the archaeological samples. The average number of alleles was 2.9 per STR: from two alleles for four primer pairs (*phi046*, *phi011*, *phi128* and *phi115*) to six alleles for the *bnlg131* primer pair. As an example, the Fig. 5 shows the results obtained with primers *phi046* and *phi115* on both archaeological and modern samples. The archaeological samples showed a value of zero (that is, where monomorphic), whereas the modern samples had a score of 2.71 (Table 3). The genetic similarity average of both samples was calculated with the application NTSYSpc.

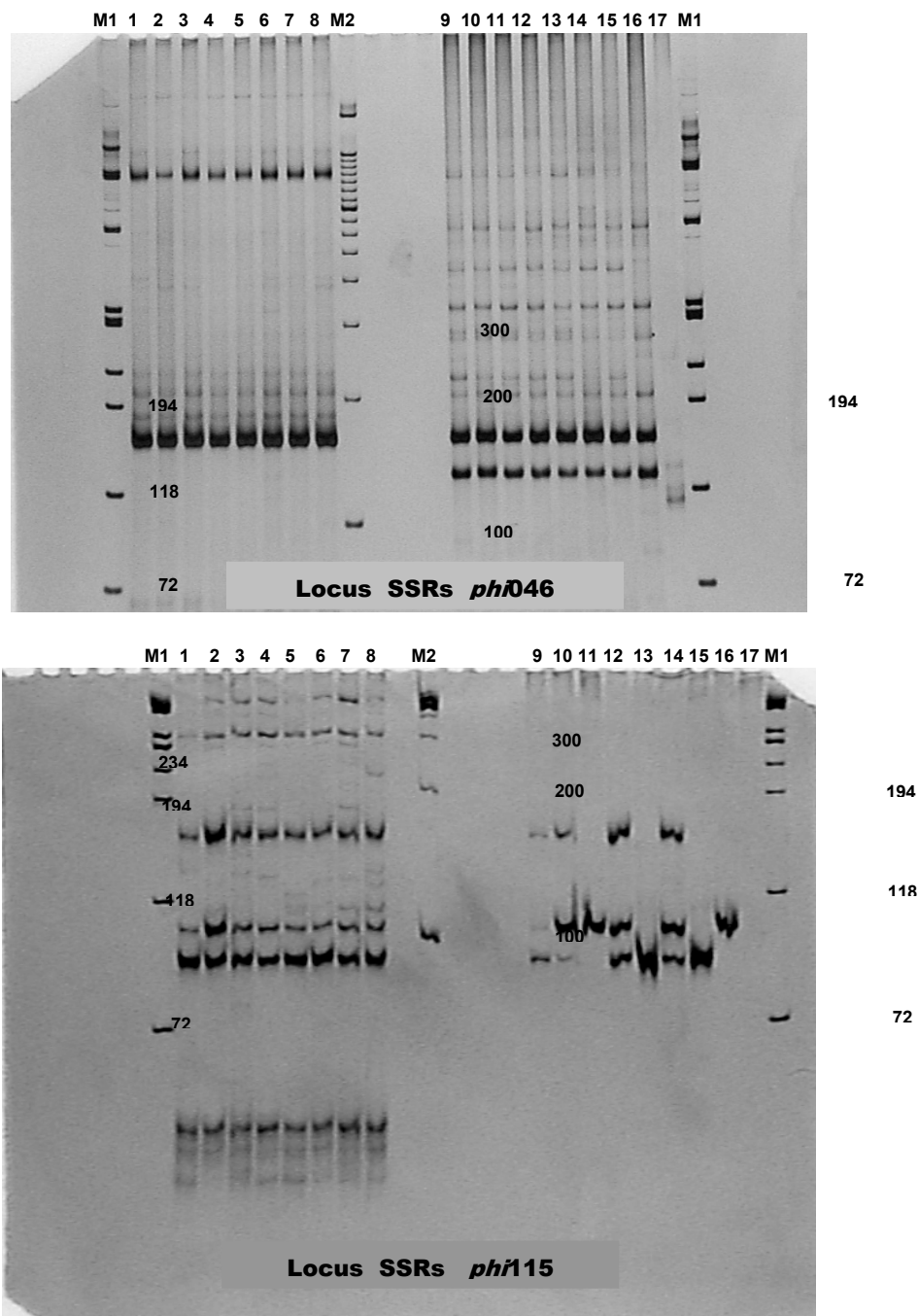


Figure 5. **PCR amplification products of both archaeological and modern corn (*Zea mays*)**. Genomic DNA was amplified using the STR primer pairs *phi046* and *phi115*, segregated on 12% (w/v) polyacrylamide gels and stained with silver nitrate. Lanes M1 & M2: "*phiX174/HaeIII*" & "100 bp ladder" molecular weight markers, respectively; lanes 1 to 8: archaeological samples (genotypes T1, T4, 513, 518, 519, 520, 525 & 526, respectively); lanes 9 to 17: modern samples (genotypes Alazán or ALA, Arizona or ARI, Mochero or MO, Pagaladroga or PAG, Huayleño or HUA, Paro or PAR, Cuzco or CUZ, CML131 or CML & K64R, respectively).

Table 3. Analysis of eight STR markers in eight archaeological samples, seven modern native breeds and two improved cultivars of corn (*Zea mays* L.).

Sample	Total bands (alleles)	Total polymorphic Bands	Average of polymorphic alleles	Average of genetic similarity
Archaeological	9	0	0	1
Modern	19	97	2.71	0.43
Total	23	21	2.90 (2 - 6)	0.44

The amplicons generated by each corn STR primer pair used in this work have a defined and known size range (Table 2), which reduces the risk of false assignments. Besides, the amplicon band images corresponding to them are available in the MaizeDB at <<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>>.

Genetic similarity matrix

The distribution range of the 153 figures of the genetic similarity matrix for the STR markers (Table 4) encompassed values from 0.08 to 1.00, with an average of 0.44 for the whole sample. The distribution range of modern samples varied from 0.08 to 0.69, with an average of 0.43 and showing 60% of values smaller than 0.50. On the other hand, as previously indicated, the archaeological samples were all alike; that is, showed the same genetic similarity value (1).

Table 4. Genetic similarity matrix (Jaccard's coefficient) between the eight archaeological samples, seven modern native breeds and two improved cultivars of corn (*Zea mays* L.).

		Archaeological corn								Modern corn ¹								
		T1	T4	513	518	519	520	525	226	ALA	ARI	MO	PAG	HUA	PAR	CUZ	CML	K64R
Archaeological corn	T1	1																
	T4	1	1															
	513	1	1	1														
	518	1	1	1	1													
	519	1	1	1	1	1												
	520	1	1	1	1	1	1											
	525	1	1	1	1	1	1	1										
	526	1	1	1	1	1	1	1	1									
Modern corn	ALA	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	1								
	ARI	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.33	1							
	MO	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.55	0.60	1						
	PAG	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.57	0.54	0.69	1					
	HUA	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.30	0.50	0.27	0.45	1				
	PAR	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.60	0.40	0.60	0.64	0.50	1			
	CUZ	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.33	0.33	0.27	0.45	0.67	0.57	1		
	CML	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.53	0.67	0.60	0.50	0.30	0.50	0.20	1	
	K64R	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.46	0.44	0.67	0.46	0.22	0.63	0.38	0.50	1

¹ALA: 'Alazán'; ARI: 'Arizona'; MO: 'Mochero'; PAG: 'Pagaladroga'; HUA: 'Huayleño'; PAR: 'Paro'; CUZ: 'Cuzco'; CML: CIMMYT improved cultivar; K64R: CIMMYT improved cultivar.

Dendrogram and clustering pattern

The Fig. 6 shows the pattern of genetic relationships of the full sample with eight STR polymorphic markers. The clustering analysis was performed at 0.45 from the interval of the Jaccard's similarity coefficient. The two samples (archaeological and modern) were clearly separated in two groups. As indicated above, all archaeological genotypes exhibited the same genetic similarity value. On the other hand, the modern sample genotypes clustered in three subgroups (A, B and C), which contained between two and five genotypes each. Thus, A was made of five genotypes: 'Alazán' (ALA), 'Mochero' (MO), 'Pagaladroga' (PAG), 'Paro' (PAR) and one improved line (K64R).

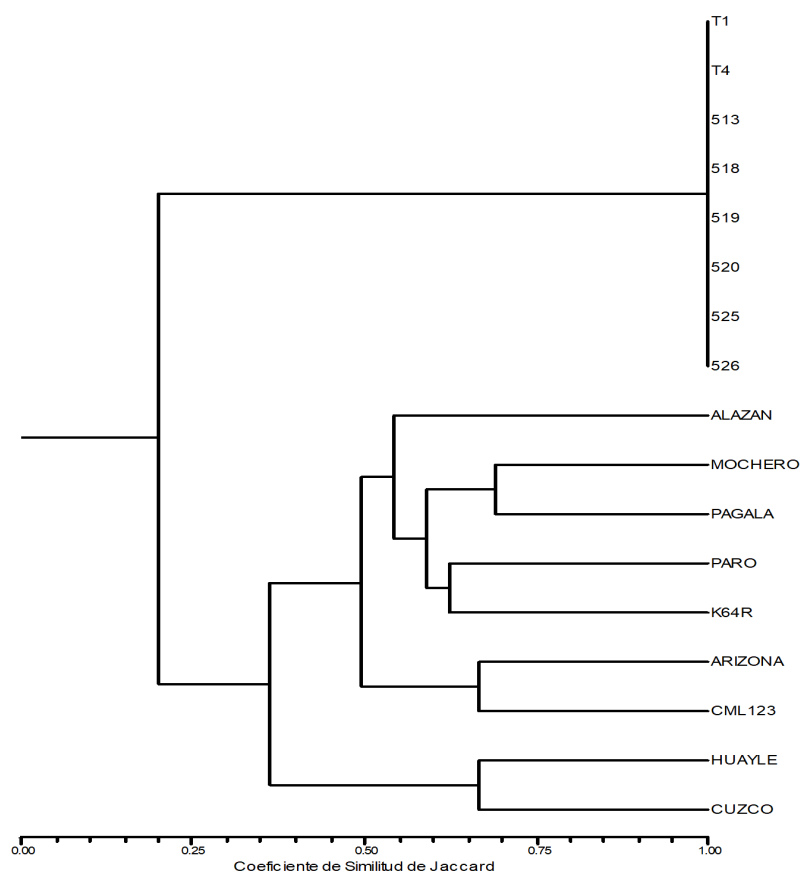


Figure 6. **Phylogenetic tree.** The dendrogram was built with STR markers using the UPGMA algorithm. It shows the genetic diversity kinships for eight archaeological Chimú samples, seven modern native breeds and two improved cultivars of corn (*Zea mays*).

The north-coastal breeds ('Mochero' and 'Pagaladroga') shared a genetic similarity average of 0.68. The B subgroup included two genotypes: 'Arizona' (ARI) and CML123 (CML), which was the other improved line. They exhibited a genetic similarity average of 0.66. Finally, the C subgroup was constituted by two genotypes: 'Huayleño' (HUA) and 'Cuzco' (CUZ), with a genetic similarity average of 0.66. This dendrogram clearly shows that the three primary north-coastal breeds ('Alazán', 'Pagaladroga' and 'Mochero') share the same cluster. This is in agreement with their geographical proximity and supports their genetic similarity. Likewise, 'Alazán' (ALA) is the breed more closely (genetically) related to the archaeological genotypes of corn.

Discussion

Archaeobotanical description of the Chimú corn collections

The data obtained in this work have allowed to affiliate some archaeological specimens of corn to proto-breeds that were present in the pre-Hispanic northern coast of Peru; particularly those that were grown during the Chimú period, both at the Chicama and the Casma valleys. The cobs from 'Puerto Pobre' showed traits typical of both north-coastal proto-breeds, as well as north-coastal intermediate proto-breeds with introgressions from highlander breeds. The isolated corn seeds from the 'El Brujo' samples would belong to seaside breeds; possibly 'Proto-Alazán' and 'Proto-Pagaladroga', which is in agreement with Grobman et al, (1961) and Sevilla (1994). The corn cultivars of the North-Peruvian coast 1.200 years ago are known as proto-forms of the 'Alazán' breed, with cylindrical and short cobs showing 10 grain strings. There is still doubt about the archaeological 'Proto-Alazán' in relation to the other two breeds sympatrically distributed ('Proto-Mochero' and 'Proto-Pagaladroga'), due to the intermediate cob traits.

Isolation, preservation degree and authenticity of the Chimú corn DNA

The isolation of nucleic acids with high molecular weight from old seed samples does not guarantee the absence of microbial contamination. Actually, it may rather be an indicative of such contamination. Thus, the isolation of partially degraded nucleic acids from the Chimú corn collections is evidence that at least part of the original genetic material of the archaeological seed has been preserved.

Other studies have also reported the isolation of partially depolymerized DNA from archaeological corn found in the north coast of Peru. One report was about poorly preserved seeds from Sipán (Moche culture; approximately 500-year AD) (Rollo et al, 1991). Another study found very low-molecular weight nucleic acids with highly degraded DNA in individual embryos of archaeological corn samples from Casma (north coast of the Department of Ancash). In yet a few more instances, some small embryos were combined in a mixed sample

to have a larger weight and thus generate a higher DNA concentration, which ranged from 0.5 to 1.0 g (Bird et al, 1995b). It must be mentioned that Sipán is about 300 km away from the sites where the Chimú corn samples (used in our work) were collected. Hard tissues and structures (like those in seeds) usually are better preserved than parenchymatic tissues. This is due to the scarcity of water and enzymes in the former, as well as their higher mechanic protection (Hermann and Hummel, 1994).

On the other hand, the abiotic conditions that may contribute to extend the preservation have been less studied. Nevertheless, it is probable that the aridity of the north coast of Peru has played a favorable role to preserve its archaeobotanical material. The collections of Chimú corn belong to coastal sites (Fig. 1) with extreme aridity, being sometimes preserved as full cobs. Such is the case for the 'Puerto Pobre' sample (Fig. 2). This likely favors the embryo protection, increasing the probabilities of extracting less degraded DNA. Pääbo (1985, 1989) has suggested that a quick dehydration is required to enhance the DNA preservation, due to the susceptibility of such molecules to the enzymatic hydrolysis. Besides, the dehydration may contribute to the differential conservation of some organelles in plant tissues. Additionally, it is expected that the dehydration would reduce the endogenous protease activities in relation to the senescence properties of the leaves. Yet, some old tissues containing DNA were preserved fully hydrated (Golenberg et al, 1990; Hagelberg and Clegg, 1991).

Another important issue affecting the preservation and authenticity of nucleic acids isolated from old samples is the possible microbial contamination and activity. Microorganisms may degrade organic material in general and nucleic acids in particular. Thus, a scanning electronic microscopy (SEM) study is recommended to evaluate the potential preservation of the samples and thus their expected proportion of old DNA (Hermann and Hummel, 1994). The samples of Chimú corn analyzed in the present work showed a good conservation and were further subjected to a topographic exploration of the head surface and endosperm by SEM. As shown in Fig. 3, no microorganisms like bacteria or fungus were detected. Besides, the starch grains and proteic bodies exhibited a good preservation and morphology. This is probably due to the quick dehydration to which the archaeological samples of the north coast of Peru are subjected along their taphonomic history, as previously indicated. The cause for dryness would be the abundant salts found in the archaeological environments of 'El Brujo' and 'Puerto Pobre', together with the limited rainfall rate, which should limit the microbial proliferation. Therefore, the microelectronic study supports the endogenous nature of the DNA isolated from the corn seeds used in our work. Similar analyses were carried out with corn seeds from a burial of the Wari culture (800 years AD), showing a well-preserved endosperm with starch grains, without evidence of contamination by bacteria or fungus (Rollo et al, 1994a). Therefore, this asepsis seems a common feature of the archaeobotanical corn material found at the north coast of Peru.

Yet another factor considered to support the authenticity of the isolated DNA is the inclusion of independent replicas for each sample. The accordance and consistency of the results generated in this work with the different extracts further supported the authenticity of the material used and the reliability of the experimental approach.

Last, but not least, perhaps the most important criterion of authenticity for the DNA isolated from the archaeological corn collections used in this work was the radiocarbon dating, which confirmed the seniority of the corn seeds and thus the old age of their DNA, as previously reported.

Isolation and amplification of archaeological and modern corn DNA

The total nucleic acids isolated from the ancient corn collections are shown on Fig. 4. Besides the contamination with exogenous DNAs, another potential problem when dealing with ancient DNA is the possible presence of unwanted coprecipitated compounds such as polysaccharides, tannins and humic acids. The latter are substances that originate in the soil and that may bind to the seed during its taphonomic history. They can be recognized by the brownish color of the DNA isolated from archaeological corn and because they generate a green-bluish fluorescence in agarose gels under UV light. Such fluorescent material may also contain sulfides and has an electrophoretic mobility on agarose gels equivalent to dsDNA fragments of about 600 bp. Those chemicals may copurify with the DNA and thus inhibit the enzymatic amplification of DNA by PCR.

The first PCR amplification trials carried out in this work failed to amplify the archaeological DNA samples. This was likely due to the presence of humic acids (known inhibitors of the PCR reaction). We performed 10 PCR trials with such ancient DNA (before removing the putative PCR inhibitors) using specific STR primers for modern corn. These trials were carried out with DNA diluted 1:50 and 1:100 fold, to try and abolish or reduce the putative inhibitory effect on the PCR as indicated by Golenberg (1991). In all cases, the result was negative; that is, no amplicon was generated. Therefore, we further purified the previously isolated DNA (ranging from 70 to 500 pb), by segregation in low melting point agarose gel electrophoresis. We detected better DNA signals in the 'Puerto Pobre' samples (possibly because they came from full cobs) and less intense bands or signals in the 'El Brujo' ones (from isolated seed grains). The gel plugs containing the orange-reddish fluorescence (that is, the DNA) for each ancient sample were excised, melted and subjected to phenol extraction to try and recover the inhibitor-free nucleic acids. Samples were not further dialyzed, since the above approach generated satisfactory amplification results.

Thus further experiments were carried out in which extra-purified samples (free of inhibitors) were used in PCR amplification reactions with the *dup014* STR primer pair of corn. Besides, we increased the concentrations of both $MgCl_2$ and *Taq* DNA polymerase recommended by

Hoisington *et al.* (1998) for modern DNA, obtaining the best amplifications with 5.0 mM MgCl₂ and 2.0 U *Taq*. Concentrations were also modified for the modern corn samples: 3.5 mM MgCl₂ and 1.5 U *Taq*. The optimal DNA concentrations in the STR amplification with *dup014* primers were 125 ng (ancient DNA) or 50 ng (modern DNA). Our DNA cycling amplification protocol by PCR generated positive results both in modern and ancient DNA. Other authors like Bird *et al.* (1995b) have used different profiles to amplify archaeological corn DNA: 30 short cycles (94° C/30 s, 61° C/50 s, and 72° C/2 min). A similar profile of 40 short cycles (93° C/40 s, 55° C/1 min, and 72° C/1.5 min) was used by Goloubinoff *et al.* (1993) to amplify archaeological corn from Peru and Chile. Therefore, the removal of PCR inhibitors and the presence of appropriate concentrations of MgCl₂ and *Taq* DNA polymerase are critical parameters to accomplish the enzymatic amplification of ancient DNA by PCR.

The design of the primers is also of paramount importance. As an example, the primer pairs *bnlg131* and *dup014* amplified well some modern genotypes, yet failed to amplify others, as previously indicated. This may indicate a suboptimal primer design likely linked with polymorphisms (like SNPs) in ancient corn STRs flanking sites, particularly at the 3'-end of the annealing targets. This problem could be alleviated or overcome lowering the annealing temperature and/or redesigning the primer(s) involved.

The above PCR conditions to amplify ancient DNA (particularly the high concentrations of MgCl₂ and *Taq*) may reduce the *Taq* DNA polymerase fidelity. In fact, it has been described that, depending on the experimental conditions, such an enzyme may generate a mutation for each 250-b polymerized (Innis *et al.*, 1988). This error rate could even increase for ancient and damaged DNA (Pääbo *et al.*, 1990). Yet, these problems are only important if the amplicons are further cloned and sequenced (since in such a case, a single molecule is usually picked up and amplified in the bacterial host). Therefore, should the amplicons be sequenced, it is advised to sequence them in both the forward and reverse senses from three independent clones or, alternatively, direct-sequence in both directions the amplicon products without cloning, thus effectively diluting the present mutations and generating a true consensus reading (Pääbo *et al.*, 1989).

Analyses of the STR polymorphism

The amplification products generated using the eight corn-specific STR primer pairs with the eight samples of archeological corn and the nine samples of modern breeds were visualized in 12% (w/v) polyacrylamide gels after electrophoresis and silver nitrate staining. This allowed a better allele separation and thus a more precise scoring of the polymorphic bands. All the eight tested primer pairs amplified the modern samples, yet only five of them amplified STR loci from ancient corn DNA. The analysis was performed under very restrictive conditions. Thus, the bands not well defined were not considered for the final analysis.

Unspecific bands of higher molecular weight may arise from ancient DNA due to the less astringent conditions commonly used in such amplifications, including higher reagent concentrations (like $MgCl_2$ and *Taq* DNA polymerase) and lower annealing temperatures. But they may also arise due to differences in the target genomic DNA. Thus, different amplicon sizes may be generated from different genotypes; particularly from archaeological ones, which may complicate their assignment and analysis. For such a reason, a range of amplicon sizes is usually associated with each primer pair (Table 2). As we have found, such a range from the Maize DB (modern corn breeds and native Mexican genotypes) does not always correspond with the amplicons obtained with the ancient corn from Peru analyzed in the present work. The sequencing of the different amplicons generated in all modern, native and ancient samples could further confirm these divergences.

The average polymorphic alleles found by the STR genotyping was rather low (2.9). The reason for it is twofold: first, the band scoring was very conservative and restrictive as previously indicated; and second, all archaeological samples were monomorphic.

Other authors have compared the STR typing of both ancient and modern corn samples. They found that whereas some specimens generated clear bands for many STR primer pairs, other samples did not produce positive results. Additionally, such authors warned that the variability found in the ancient specimens was not consistent or repetitive. As a consequence, they could not properly define the genetic structure of old corn populations at the north coast of Peru (Bird et al, 1995a, b). Similar results have been published for seed DNA from archaeological corn; although they were genetically informative, they did not show polymorphism between ancient and modern samples (Rollo et al, 1994a,b). It has been proposed that, in general, the polymorphisms based in both the copy number and sequence variation at nuclear DNA regions might be a better approach than the polymorphisms based only on the sequence variation for diachronic genetic studies of ancient seeds (Rollo et al, 1994b).

Kinship among the analyzed samples

The total number of STR sequences in the corn and other plant species is surprisingly high (Senior and Heun, 1993). Thus, it has been considered that the corn genome may hold about $10^4 - 10^5$ copies of the microsatellites $(GT)_n$ and $(AG)_n$ (Condit and Hubbel, 1991); having about 5×10^3 and 3×10^5 copies for $(AC)_n$ and $(AG)_n$ microsatellites, respectively (Cregan, 1992).

The inherent instability of the STR sequences make them extremely useful for both evolutive and genetic studies. Such a high mutation rate is mostly due to changes in the copy number of the basic structural unit or pattern of bases that does repeat in a tandem fashion, building the microsatellite (e.g., GT). Yet, not all STRs are equally unstable, simply because not all are equally prone to the mutation processes (Eisen, 1999).

We have analyzed eight corn STR sequences based on their genome location and high polymorphism level as described in the Maize DB. Theoretical considerations indicate that it is necessary to study several loci to establish reliable phylogenetic relationships. Additionally, it is recommended to analyze 30-50 STRs for evolutive studies. This would allow to classify the archaeological corn samples in clusters with higher accuracy and precision, thus generating better phylogenetic relationships (Smith and Helentjaris, 1994).

The genetic similarity matrix generated in this work (Table 4) demonstrates that the STR markers used span from 0.08 to 1, with an average of 0.44 for the full sample. As deduced from such similarity value of 1, and as shown in the clustering pattern of the dendrogram, the archaeological samples were monomorphic (Fig. 6). It is plausible that the ancient corn population from which the samples were obtained was rather homozygous. This is not surprising, since although the corn is an allogamous plant, it is possible to fix all the evaluated loci by means of genetic drift events, which might be further emphasized in small populations. Thus, the analyzed populations could have been a food source for just a few families. More importantly, they likely maintained their corn breed saving just a few cobs for the next sowing, instead of flailing all the cobs of the crop and then choosing the best grains as the next generation seeds. This latter approach would be the best one to maintain and even increase the genetic variability of the population along generations. On the contrary, the first method would favor the consanguinity and would drastically reduce the genetic variability and heterosis of the corn population after a few generations of practice. Curiously, such “old and inbreeding” procedure can be observed even nowadays among the farmers of the villages nearby the sampled archaeological sites. In fact, they store their cobs inside river sand to protect them from insects and other pests, optimizing the seed viability. Obviously, they are not aware of the endogamy and lack of genetic variability that such procedure represents.

The previously described endogamic practice would imply that very few individuals indeed would contribute to each new corn generation. Therefore, the true (genetic) size of the population would be reduced with every corn generation in which such human groups of farmers would remain isolated (i.e., with no corn germplasm interchange with other humans). In relation with that, it must be stressed that the distance between the two archaeological sites (‘El Brujo’ and ‘Puerto Pobre’) from which the ancient corn samples evaluated in this work came from is just 220 km. Besides, the radiocarbon dating assigned 440 ± 50 years to the ‘Puerto Pobre’ samples; that is, between 1.415- and 1.520-years AD. On the other hand, the ‘El Brujo’ samples have an age of 590 ± 70 years; that is, between 1.300- and 1.420-years AD. Consequently, these facts suggest that at some time in their history there had been contacts between the different valleys, which were incorporated into the Chimu state after different stages of expansion of this empire (Keatinge, 1974). This can explain such corn germplasm interchange, as demonstrated by Bird (1990). To support this rationale, the written records of the Spanish chronicler’s report that the corn was harvested in the Chicama valley (‘El Brujo’) and was then carried to ‘Huanchaco’ (Moche valley). From there it was shipped

by sea vessels to a small fisherman bay known as 'Los Chimos' (near Casma and 'Puerto Pobre'), where it was a very valued commodity (Cristóbal Campana, 2001 personal communication). This historic interchange of corn germplasm between both archaeological sites would reinforce our hypothesis that both ancient DNA samples had had a common stabilized pool of genes, which could be put to the test analyzing more STR markers.

On the other hand, there are evidences that the corn breed known as 'Cuzco' has had significant influence in the Andes (including several cultivars from the coast and mountain range exhibiting a large grain and a low number of narrow rows). Additionally, it has been demonstrated the presence of the 'Cuzco' breed in the Peruvian coast, both as pictorial representations in the ceramic of the Mochica and Chimú cultures, as well as by the Spanish chroniclers which frequently wrote about such a corn breed (Sevilla, 1994). Yet, we have not detected such evidences in our STR study.

The UPGMA-based dendrogram (Fig. 6) also demonstrates that the 'Cuzco' breed is clustering (group 'C') with the 'Huayleño' breed, segregated from the group 'A' made of the three north-coastal breeds ('Alazán', 'Mochero' and 'Pagaladroga'). Similar results were also found in a study of molecular characterization of the modern breeds of Peruvian corn using 90 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers; the 'Cuzco' breed did not cluster together with any other north-coastal breed (Blas et al, 1998). In relation to the group 'A' (Fig. 6), and based on morphological and cytogenetic data, Grobman et al, (1961) proposed that the 'Proto-Alazán' was an evolutionary product of early hybridizations between 'Proto-Mochero' and 'Proto-Pagaladroga'. Nevertheless, it has been also proposed that the 'Proto-Mochero' is related to both the 'Huachano' and 'Pardo', which are south-coastal breeds and that very likely could have relationships with the 'Puerto Pobre' corn, based on its intermediate allocation in the Peruvian coast.

Currently, the north-coastal breeds like 'Mochero', 'Alazán' and 'Pagaladroga' have a limited distribution in the Departments of the north coast of 'La Libertad', Lambayeque and Piura, at elevations lower than 50 m over the sea level (m.o.s.l.). In the north coast, the corn breed 'Mochero' is secondarily used (after 'Alazán') as raw material for the manufacture of the *chicha*, a local fermented drink (Manrique, 1997).

There are evidences about the existence of 'Mochero' as a different breed ('Proto-Mochero') in prehistoric ages and in the same area where it is found today. Undoubtedly, 'Mochero' is a direct descendant of the early popcorn named 'Confite Iqueño', which grew in the coast with very limited hybridizations preceding the formation of this kind of maize. The hybridizations between 'Mochero' and 'Pagaladroga' (another coastal breed) are also very probable. Thus, a few endogamous lines derived from 'Mochero' exhibit typical 'Pagaladroga'-like cobs. 'Mochero' is also related to a complex of similar floury breeds, widely distributed along the full Peruvian coast (Grobman et al, 1961).

As indicated above, the other north-coastal breed is 'Pagaladroga', distributed in valleys from Trujillo to Piura. It is almost extinct nowadays, yet it can still be found at a few farms, growing in mixed batches with 'Alazán'; particularly in the small area of Pueblos on the extremely arid riverside of the 'La Leche' valley, on the north side of the Department of Lambayeque. Probably, this breed was widely distributed (as 'Proto-Pagaladroga') in the north and central coast of Peru, during the Formative (Cupisnique and Salinar) and Classic periods (Moche and Chimú). 'Pagaladroga' derived in the north Peruvian coast from an ancestor similar to the current 'Confite Puntigado'. Very likely it had a red pericarp, as exhibited by the pre-Hispanic corn specimens. This breed also has very close phylogenetic relationships with 'Confite Iqueño', ancestor of the 'Mochero' breed. On the other hand, it is possible that 'Confite Puntigado' hybridized with the ancestor of 'Mochero', and that the resulting offspring was 'Pagaladroga', the other north-coastal breed (Grobman *et al.*, 1961). We could not evaluate the 'Confite Puntigado', since the active collections of such a breed were depleted at the corn germplasm of the CIMMYT.

These genetic relationships between the two north-coastal proto-breeds ('Mochero' and 'Pagaladroga') with 'Confite Puntigado', could represent an efficient strategy to exhibit more quickly the phenotype of the coastal Chimú cobs, when crossed with 'Puerto Pobre' specimens (Fig. 2, 7-525-PP), which show imbricated and acuminate grains. Nevertheless, there is also the possibility of an interbreed with another highlander corn like 'Paro' (Department of Apurímac), which exhibits higher genetic similarity with the coastal breeds (Grobman *et al.*, 1961). In fact, there are morphological evidences of a strong introgression of highlander breeds in the 'Puerto Pobre' sample, although the chronology is not clear. Nevertheless, those morphological evidences have not been confirmed with molecular studies. Thus, the coastal proto-forms previously indicated keep on maintaining their genetic uniformity, although their genome had experienced some kind of introgression from germplasms of other breeds at different moments in their evolutive history.

Acknowledgements

The authors are grateful to the following people: Suketoshi Taba (Corn and Wheat Germplasm Bank Manager, CIMMYT), Mireille Khairallah, Marilyn Warburton, Bacilissa Luna Garrido, Margarita Crosby and Isabel Almanza (CIMMYT). We are also indebted to Luis Morett Alatorre, Ernestina Valádez Moctezuma, Ricardo Gaspar Hernández, María Elisa Alvarado and Augusto Cámara Motta ("Universidad Autónoma Chapingo", Mexico), as well as Araceli Montiel and Mario Herrera ("Universidad de Veracruz", Mexico), Jonathan D. Kent (Metropolitan State College of Denver, CO, USA), Arturo Morales and Eufrosia Roselló ("Universidad Autónoma de Madrid", Spain), and Eduardo Achútegui Giraldo ("Universidad Nacional de Trujillo", Peru). This research was supported by the following centers and institutions: "Centro de Biotecnología Aplicada, Laboratorio de Genética Molecular Aplicada y Banco de Germoplasma de Maíz, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo" (CIMMYT, Mexico); "Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Autónoma Chapingo" and "Museo Nacional de Agricultura Prehispánica" (Mexico).

References

- Bird R (1978): Archaeological maize from Peru. *Maize Genetics Cooperation News Letter* 52: 90-92.
- Bird R (1979): The evolution of maize: a new model for the early stages. *Maize Genetics Cooperation News Letter* 53: 53-54.
- Bird R (1980): Maize evolution from 500 B.C. to the present. *Biotropica* 12: 30-41.
- Bird R (1985): Ancient tiny cobs and the evolution of Zea. *Maize Genetics Cooperation News Letter* 59: 43.
- Bird R (1989): Maize, man and vegetation in north-central Peru. Pp. 447-468. Bock JH and Linhart YB (eds.) *The evolutionary ecology of Plants*. Westview Press, Boulder, CO (EUA).
- Bird R (1990): What are chances of finding maize in Peru dating before 1000 B.C? Reply to Bonavía and Grobman. *American Antiquity* 55: 828-840.
- Bird R (1994): Manual for the measurement of maize cobs. Pp. 5-22. Johannessen S and Hastorf CA (eds.) *Corn and culture in the Prehistoric New World*. Westview Press. Boulder, CO (EUA).
- Bird R, Bird J (1980): Gallinazo maize from the Chicama valley, Peru. *American Antiquity* 45: 325-332.
- Bird R, Bohorova N, González de León D, Hoisington D (1995a): Old maize and ancient DNA. *Maize Genetics Cooperation News Letter* 69: 99-100.
- Bird R, Bohorova N, Gonzalez de León D, Hoisington D (1995b): New Life for Ancient Seeds Projects. Final report in conjunctions with ARQUEOBIOB supported by DANIDA. "Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo". Pp. 26.
- Blas R, Ribout J, Sevilla R, Chura J (1998): Avances de caracterización molecular de razas de maíz peruanas. *Informe Técnico presentado al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo* (CIMMYT), 40 p.
- Bonavía D (1982): *Precerámico Peruano. Los Gavilanes. Mar, Desierto y Oasis en la Historia del Hombre*. Corporación Financiera de Desarrollo, S. A. COFIDE, Instituto Arqueológico Alemán. Lima (Peru).

- Bonavía D, Grobman A (1978): El origen del maíz andino. Pp. 82-91. H. Trimborn and U. Oberem (eds.) *Amerikanistische Studien I. Festschrift for H. Trimborn I Collectaneu Institutu Anthropos 20*, Berlin (Germany).
- Condit R, Hubbel SP (1991): Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34:66-71.
- Cregan PB (1992): Simple Sequence repeat DNA Length Polymorphism. *Probe* 34:18-22.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983): A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Report* 4:19-21.
- Doebley JF (1994): Morphology, molecules and maize. Pp. 101-112. En: Johannessen, S. and Hastorf, C. A. (eds.) *Corn and Culture in the Prehistoric New World*. Westview Press, Boulder, CO (EUA).
- Dunn ME (1979): Ceramics depictions of maize: a basis for classification of prehistoric races. *American Antiquity* 44: 757-774.
- Eisen JA (1999): Mechanistic basis for microsatellite instability. Pp. 34-48. Goldstein DB & Schlottere C (eds.) *Microsatellite Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford (RU).
- Engel FA (1987): *De las begonias al maíz. Vida y Producción en el Perú Antiguo*. Centro de Investigaciones de Zonas Áridas (CIZA), Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru).
- Galinat WC (1970): The cupule and its role in the origin and evolution of maize. *Bulletin* 565, Massachusetts Agricultural Experiment Station, University of Massachusetts, Amherst (EUA).
- Golenberg EM (1991): Amplification and analysis of Miocene plant fossil. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 333: 419-427.
- Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley C, Durbin M, Henderson D, Zurawski C (1990): Chloroplast DNA sequences from a Miocene *Magnolia* species. *Nature* 344: 656-658.

- Goloubinoff P, Pääbo S, Wilson AC (1993): Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *adh2* gene segment from archaeological specimens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 1997-2001.
- Grobman A, Salhuana W, Sevilla R, Mangelsdorf P (1961): *Races of maize in Peru, their Origins, Evolution and Classification*. Publication 915, National Academy of Science, National Research Council, Washington, D.C. (EUA), 374p.
- Hagelberg E, Clegg JB (1991): Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceeding of the Royal Society of London*. 244: 45-50.
- Harlan JR (1971): Agricultural origins: centers and noncenters. *Science* 174: 468-474.
- Hawkes JG (1991): Centros de diversidad genética vegetal en Latinoamérica. *Diversity* 7: 7-9.
- Helentjaris T (1988): Does RFLP analysis of ancient Anazasi samples suggest that they utilized hybrid maize? *Maize Genetic Cooperation Newsletter* 62: 104-105.
- Henry RJ (2001): Exploiting cereal genetic resources. *Advances in Botanical Research* 34: 23-57.
- Hermann B, Hummel S (1994): *Ancient DNA. Recovery and Analysis of Genetic material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical and Forensic Specimens*. 1ª ed, Springer-Verlag, New York 263p.
- Hoisington D, Khairallah M, González de León D (1998): *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Mexico D. F. CIMMYT (3rd edition).
- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA (1988): DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85: 9436-9440.
- Jaccard P (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. '*Bulletin Society Vaud Science Natural*' 44: 223-270.
- Keatinge RW (1974): Urban settlement systems and rural sustaining communities: an example from Chan Chan's hinterland. *Journal of Field Archaeology* 2: 215-227.
- Manrique PM (1997): *El maíz en el Perú*. 2ª edición, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), 362p.

- Pääbo S (1985): Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.
- Pääbo S (1989): Ancient DNA extraction, characterization molecular cloning and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 1939-1943.
- Pääbo S, Higuchi RG, Wilson AC (1989): Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *Journal of Biological Chemistry* 265: 4718-4721.
- Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC (1990): DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *Journal of Biological Chemistry* 265: 4718-4721.
- Pearsall DM (1986): La Circulación Primitiva del Maíz entre Mesoamérica y Sudamérica. Pp. 231-258. Jorge Marcos (ed.) *Arqueología de la costa ecuatoriana: Nuevos Enfoques*. Guayaquil (Ecuador).
- Rohlf FJ (1997): NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.00. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, NY (EUA).
- Rollo F, Venanzi FM, Amici A (1994a): DNA and RNA from ancient plant seeds. Pp. 218-236. Hermann & Hummel (eds.) *Ancient DNA*. Springer-Verlag, New York, NY (EUA).
- Rollo F, Ascii W, Sassaroli S (1994b): Assessing the genetic variation in pre-Columbian maize at that molecular level. Pp. 27-34. Adams RP, Miller JS, Golenberg EM and Adams J.E (eds.). *Conservation of Plant Genes II: Utilization of ancient and modern DNA*. Mo. Botanical Garden. St. Louis, MO (EUA).
- Rollo F, Venanzi FM, Amici A (1991): Nucleic acids in mummified plant seeds: biochemistry and molecular genetics of pre-Columbian maize. *Genetical Research* 58: 193-201.
- Sambrook J, Russell DW. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Senior ML, Heun M (1993): Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884-889.
- Sevilla R (1994): Variation in modern Andean maize and its implications for prehistoric patterns. Pp. 219-244. Johannessen, S. and Hastorf, C. A. (eds.). *Corn and Culture in the Prehistoric New World*. Westview Press, Boulder, CO (EUA).

Smith S, Helentjaris T (1994): Integrating molecular and anthropological approaches to understand the co-evolution of maize and human cultures. Maize archaeobotanical investigations using DNA analytical methods. From an oral presentation. Held at the Holiday in Gateway Conference Center. Ames, Iowa, August 29-31. Sponsored Jointly by Pioneer Hi-Bred International, Iowa (EUA).

Towle M (1961): *The Ethnobotany of Precolumbian Peru*. Viking Fund Publications in Anthropology 30, New York NY (EUA). 245p.

Wang RL, Stec A, Hey J, Lukens L, Doebley JJ (1999): The limits of selection during maize domestication. *Nature* 398: 236-239.

Yacovleff E, Herrera F (1934): El mundo vegetal de los antiguos peruanos. *Revista del Museo Nacional* 3: 241-322. Lima (Peru).



Razas nativas arqueológicas y contemporáneas de maíz (*Zea mays*) del norte del Perú: filogenia mediante toma de huellas dactilares por microsatélites (STR)

Víctor F. Vásquez¹, José Arceo[†], Teresa E. Rosales², Klaus Koschmieder^{††}, José Luis Caballero³ y Gabriel Dorado⁴

¹Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleocológicas Andinas, ARQUEOBIOS, C/ Martínez de Compañón 430-Bajo 100, Urbanización San Andrés, 130008 Trujillo (Perú)Trujillo, Perú; [†]Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Autónoma Chapingo, México; ²Laboratorio de Arqueobiología, Avda. Juan Pablo II s/n, Universidad Nacional de Trujillo, 13001 Trujillo (Perú); ^{††}Freie Universität Berlin, Alemania; ^{3,4}Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, España

Resumen

Se utilizaron microsatélites para evaluar y comparar las relaciones de linaje y la diversidad genética de dos cultivares mejorados de maíz (*Zea mays* L.), siete razas nativas modernas y ocho muestras arqueológicas Chimú (1.100-1.500 d.C.) de la costa norte peruana. Se requirió electroforesis para eliminar los inhibidores de la PCR del ADN antiguo. Ocho pares de cebadores STR generaron amplicones del genoma del maíz moderno, pero sólo cinco amplificaron el ADN del maíz antiguo. Para establecer las relaciones de linaje entre muestras se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard y la técnica de análisis de conglomerado con promedio de unión. Así, se determinó el patrón de relaciones genealógicas y genéticas de los genotipos. Siete de los ocho pares de cebadores SSR revelaron polimorfismo, siendo 2,47 (rango 2-6) el promedio de alelos polimórficos. El total de alelos probados fue 23, con 97 bandas polimórficas para el maíz moderno, pero monomórficas para el maíz Chimú, generando un promedio de similitud genética de 0,44 y 1, respectivamente. Estos resultados sugieren la existencia de endogamia en algunas poblaciones de maíz Chimú de la costa norte del Perú hace 500 a 900 años. Las razas modernas exhibieron un mayor polimorfismo, debido a la hibridación y a una mejor selección asistida, de acuerdo con los datos citogenéticos.

Palabras clave: dendrograma, marcadores moleculares, repeticiones cortas en tándem, repeticiones de secuencia única, historia tafonómica, UPGMA

Abstract

Microsatellites were used to evaluate and compare the lineage relationships and genetic diversity of two improved cultivars of corn (*Zea mays* L.), seven modern native races, and eight archaeological Chimú samples (1.100-1.500 AD) of the North Peruvian coast. Electrophoresis was required to remove the PCR inhibitors from ancient DNA. Eight STR primer pairs generated amplicons from the genome of modern corn, but only five amplified ancient corn DNA. To establish the lineage relationships among samples, the coefficient of similarity of Jaccard and the technique of analysis of conglomerate with binding average were used. Thus, the pattern of genealogical and genetic relationships of the genotypes were determined. Seven out of the eight pairs of SSR primers revealed polymorphism, being 2.47 (range 2-6) the average of polymorphic alleles. The total alleles tested were 23, with 97 polymorphic bands for the modern corn, yet being monomorphic for the Chimú corn, generating an average of genetic similarity of 0.44 and 1, respectively. These results suggest the existence of inbreeding in some populations of Chimú corn of the north coast of Peru 500 to 900 years ago. Modern races exhibited higher polymorphism, due to hybridization and better assisted selection, in agreement with cytogenetic data.

Key words: dendrogram, molecular markers, short tandem repeats, single sequence repeats, taphonomy history, UPGMA

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es el tercer cultivo mundial en importancia económica después del trigo (*Triticum aestivum* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.). Los registros arqueológicos del maíz se remontan a 7.000 años. El maíz se originó en el continente americano a partir de especies silvestres (“teocintles” o “teosintes”), que tenían una apariencia muy diferente al maíz moderno, propagándose hacia América del Sur antes de la conquista española. Actualmente se acepta que la domesticación del maíz se logró mediante la selección de elementos reguladores del gen teosinte branch (tbi). En realidad, la variación en la región codificante del gen es similar en el maíz y el teosinte modernos (Wang et al, 1999). El proceso generó nuevas variedades de maíz con ramas cortas terminadas en mazorcas en lugar de ramas largas con borlas en la punta. Se cree que tales rasgos quedaron fijados durante cientos de años de selección humana junto con introgresiones después de cruces accidentales de razas cultivadas con especímenes silvestres de teocintle (Henry, 2001).

Varias evidencias arqueológicas sugieren que el maíz se cultivaba de forma independiente en el Perú, lo que demuestra una gran cantidad de razas. Este hecho ha sido considerado para proponer al Perú como un centro de domesticación independiente (Grobman et al, 1961; Bonavía y Grobman, 1978). Sin embargo, la ausencia de los prototipos silvestres *Zea mexicana*, *Z. diploperennis* y *Z. perennis* (los teocintes o parientes silvestres del maíz), que sólo se encuentran en Mesoamérica y Centroamérica, plantea dudas sobre la domesticación independiente del maíz en Sudamérica. Por lo tanto, actualmente se acepta que el Perú era más bien un centro secundario de diversidad (Hawkes, 1991).

Hasta el momento se han descrito 132 razas de maíz en la región andina. Hasta 55 de ellos han sido considerados típicos peruanos, definidos a partir de caracteres morfológicos y citogenéticos (Grobman et al, 1961). La descripción de estas razas es bastante complicada debido a la falta de una diferenciación clara entre algunas de ellas. Esto es consecuencia de la continua recombinación genética, junto con mutaciones, hibridaciones y falta de aislamiento geográfico que impiden la fijación del genotipo. Estos factores han contribuido a la gran variación genética encontrada en este cultivo, la cual ha sido analizada en dos niveles: arqueobotánico (Yacovleff y Herrera, 1934; Grobman et al, 1961; Towle, 1961; Galinat, 1970; Bird, 1978, 1980, 1985, 1989, 1990, 1994; Dunn, 1979; Bird y Bird, 1980; Bonavía, 1982) y evolutivo (Harlan, 1971; Bonavía y Grobman, 1978; Bird, 1979, 1980, 1990; Pearsall, 1986; Engel, 1987).

Las condiciones climáticas de la costa peruana (uno de los desiertos más áridos del mundo) han favorecido la conservación de grandes cantidades de restos arqueológicos de maíz (brotes, hojas secas, semillas e incluso mazorcas enteras). Esto ha permitido el desarrollo de una gran cantidad de estudios sobre el cultivo temprano de este cultivo en la prehistoria de la costa peruana. Sin embargo, los

estudios sistemáticos para conocer los aspectos evolutivos y genético-moleculares del maíz antiguo son escasos. Este tipo de conocimiento es muy interesante, ya que permitiría determinar las huellas y patrones de diversidad molecular en el maíz antiguo. Además, la comparación de datos moleculares entre razas antiguas y modernas arrojará nueva luz para explicar las relaciones genéticas y los patrones de evolución a lo largo de la domesticación y la historia del mejoramiento del maíz.

Un aspecto particularmente importante del análisis de los especímenes arqueológicos de maíz es el establecimiento de su identidad racial. Esto se ha logrado en el pasado basándose únicamente en aspectos morfológicos tanto de las mazorcas de maíz (tamaño, forma, número de hileras, semillas por hileras, etc.) como de las semillas (forma, color, etc.). Sin embargo, estos rasgos pueden verse modificados por las condiciones ambientales predominantes durante el cultivo y la conservación de las plantas, incluida la humedad ambiental, la compresión y la fragmentación. Todos estos factores, unidos al manejo humano, pueden dificultar una correcta identificación.

Afortunadamente, las tecnologías de huellas dactilares de ADN pueden aprovecharse para identificar y clasificar adecuadamente las muestras arqueológicas de maíz. El genotipado basado en ADN es de hecho un nuevo enfoque valioso para determinar la identidad, la evolución y la filogenia (Doebley, 1994). Así, se ha informado del aislamiento de ADN de alto peso molecular (1,5 - 2,0 kpb) de mazorcas de maíz sin semillas de 4700 ± 500 años de antigüedad de Perú y Chile. Esto permitió realizar comparaciones alélicas de un fragmento del gen *adh2* en tres especímenes arqueológicos, cuatro tipos de teocintle y cuatro razas modernas de maíz. Algunos alelos antiguos del gen *adh2* eran idénticos o estaban estrechamente relacionados con los alelos modernos del maíz. Estos hallazgos señalaron tres cuestiones: que el genoma del maíz es muy antiguo, que hubo un proceso de domesticación previo a la introducción en América del Sur y, finalmente, el desarrollo de variedades modernas de maíz a partir de poblaciones silvestres (Goloubinoff et al, 1993).

Otro estudio basado en ADN sobre maíz arqueológico de Perú se llevó a cabo con nueve mazorcas bien conservadas recuperadas de un entierro de la cultura Wari (600-850 años d.C.). Fueron clasificados tentativamente como 'Proto-Pagaladroga', ya que la datación por radiocarbono les asignó 980 ± 95 años (con referencia al año 1.950). Los ácidos nucleicos se extrajeron de las semillas usando fenol y se segregaron mediante fraccionamiento por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% (p/v). El material aislado mostró un bajo peso molecular. Estos resultados se confirmaron aún más mediante marcaje con ATP radiactivo y electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % (p/v). La secuenciación del ADN amplificado mostró diferencias respecto al maíz moderno. Esto representa la primera evidencia que demuestra claramente que las semillas de maíz Wari contienen ADN endógeno (Rollo et al, 1994a).

También se ha reportado el aislamiento de ADN de alto peso molecular (hasta 20 kpb) a partir del maíz arqueológico nativo norteamericano 'Anazasi' del siglo XII.

Esto permitió la aplicación de la metodología del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y, por tanto, comparaciones alélicas entre maíz arqueológico y moderno (Helentjaris, 1988). Sin embargo, aunque el autor demostró que se puede extraer una cantidad suficiente de ADN de buena calidad de las mazorcas arqueológicas para el análisis RFLP, el pequeño número de sondas probadas no permitió un análisis filogenético.

Trabajos anteriores han informado comparaciones de maíz Chimú con razas modernas de la costa norte de Perú utilizando herramientas moleculares como ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) en el “Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo” (CIMMYT, México). El ADN se extrajo de un total de 22 muestras arqueológicas. El procedimiento RAPD realizado en CIMMYT permitió amplificar cuatro muestras arqueológicas nativas, tres razas montañosas modernas y un cultivar panameño. Los cebadores utilizados generaron pequeños amplicones de ADN (generalmente entre 70 y 220 pb), pero no se pudieron establecer relaciones filogenéticas debido al pequeño número de alelos comparados (Bird et al, 1995b).

Por otro lado, los patrones arqueológicos predicen que la raza 'Cuzco' podría estar más relacionada con el maíz Chimú que con otras razas geográficamente más próximas (Bird et al, 1995b).

El propósito del presente trabajo fue superar los métodos de clasificación basados en rasgos morfológicos para establecer la identidad y diversidad racial de los restos arqueológicos de maíz y sus vínculos de parentesco. Para ello hemos utilizado la metodología de microsatélites basada en ADN, también conocida como Repeticiones Cortas en Tándem (STR) o Repeticiones de Secuencia Única (SSR). Este procedimiento permitirá descifrar las relaciones genéticas entre el maíz Chimú y las razas modernas de la costa norte peruana. Además, quisimos evaluar la hipótesis de una hibridación entre razas de maíz del Norte ('Alazán', 'Pagaladroga', 'Mochero' y 'Arizona') y del Sur ('Huayleño', 'Paro» y 'Cuzco') cuando los Chimú fueron conquistados por los Incas (Cordillera Sur), que probablemente produjeron un intercambio de germoplasma de maíz.

Materiales y métodos

Colecciones arqueológicas de maíz

Las muestras arqueobotánicas de maíz (*Zea mays* L.) fueron descubiertas en dos proyectos arqueológicos que actualmente se ejecutan en la costa norte peruana. En ellos se recuperó una cantidad importante de restos antiguos de maíz relacionados con la cultura Chimú (1.100-1.500 años d.C.). Los sitios muestreados incluyeron los complejos arqueológicos de 'El Brujo' (Departamento de La Libertad), particularmente de viviendas; y 'Puerto Pobre' (Departamento de Ancash) (Fig. 1), tanto para viviendas como para basurales. La colección 'El Brujo' estuvo compuesta por dos muestras bien conservadas: T1 y T4, que incluyeron 45 y 28 semillas aisladas, respectivamente. La colección 'Puerto Pobre' estuvo compuesta por seis muestras de mazorcas completas (Fig. 2): 3-513-PP, 4-518-PP, 5-519-PP, 6-520-

PP, 7-525-PP y 8-526-PP. Se eligió una muestra promedio de 40 semillas de la porción central de la mazorca, donde se esperan los alelos mejor conservados. Se obtuvieron las autorizaciones pertinentes del Instituto Nacional de Cultura (Perú) para las correspondientes exportaciones y estudios de marcadores de ADN (México), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) (España) y datación por radiocarbono (Dinamarca y EE.UU.), teniendo en cuenta los escenarios culturales originales.

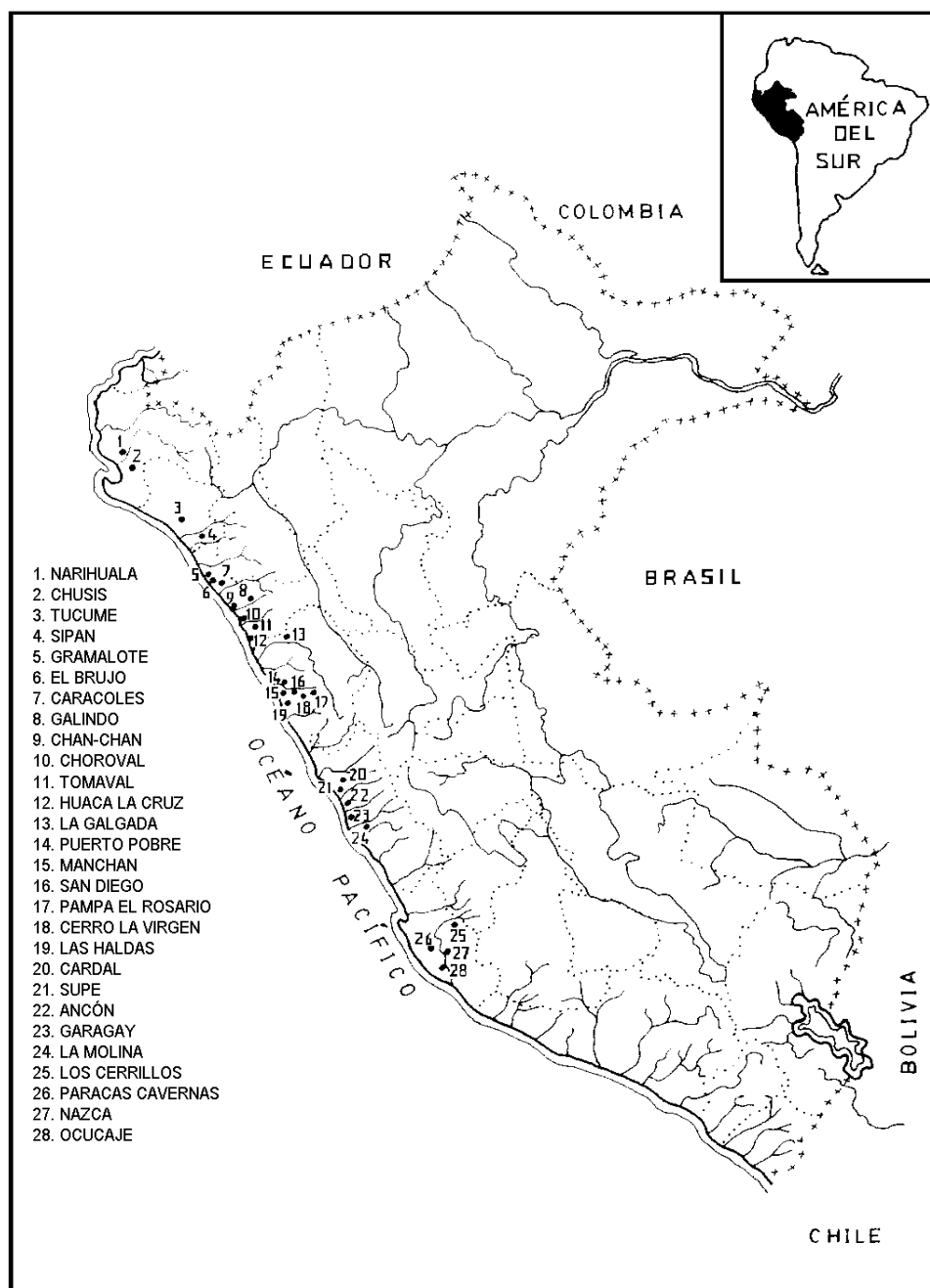


Figura 1. Sitios arqueológicos. Ubicación geográfica de los principales restos arqueológicos de maíz (*Zea mays*) en la costa peruana.

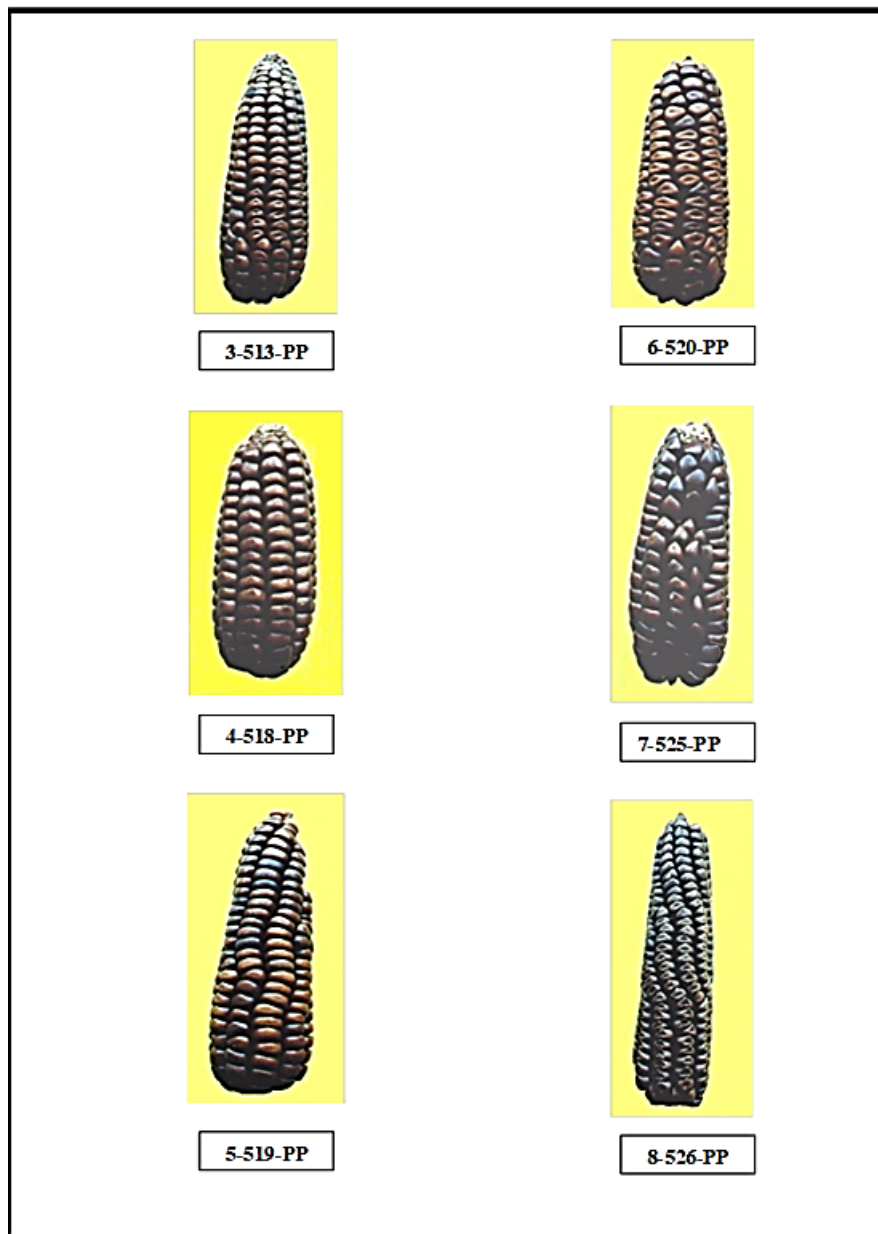


Figura 2.- Colecciones de maíz (*Zea mays*) arqueológico Chimú

Muestras modernas: selección y siembra de razas de maíz.

Hemos utilizado siete razas nativas de maíz peruano (Tabla 1) y dos cultivares mejorados generados en el CIMMYT. Las muestras de Perú incluyeron 'Alazán', 'Pagaladroga', 'Mochero' (razas primarias) y 'Arizona' (raza secundaria), cultivadas en la costa norte; 'Huayleño' (raza primaria) de la Cordillera de Ancash; y 'Paro' y 'Cuzco' (razas primarias) de la zona sur. Finalmente, las muestras del CIMMYT (CML123 y K64R) tenían genealogías conocidas y, por lo tanto, se utilizaron como controles positivos.

Las semillas modernas se obtuvieron del Banco de Germoplasma de Maíz del CIMMYT y se sembraron en macetas de 50 cm de altura que contenían un sustrato mixto descontaminado con bromuro de metilo y compuesto por cantidades iguales de arena, tierra y estiércol. Tres semanas después de la germinación de las semillas en el invernadero, se extirparon de cada planta 4 g de tejido foliar joven y sano. Para aumentar la variabilidad de las muestras, se analizaron tres plantas de cada raza. Las hojas se cortaron con tijeras esterilizadas y se lavaron con etanol al 70% (v/v) para eliminar posibles restos de suciedad o microorganismos como bacterias y hongos.

Tabla 1. Razas modernas nativas de maíz (*Zea mays* L.) del Perú analizadas en este trabajo.

Sorting number	Accession number	Pedigree	Breed (acronym)	Altitude ¹ (m.o.s.l.)	Place of origin (reference)
1	8955	Perú 585	Alazán (ALA)	55	Lambayeque (74-440-0)
2	15454	Perú 752	Huayleño (HUA)	2600	Chiclayo (Q95-87)
3	8917	Perú 382	Paladroga (PAG)	55	Lambayeque (76-80-0)
4	13526	Perú 526	Cuzco (CUZ)	—	Chiclayo (Q94)
5	—	—	Paro (PAR)	—	Chiclayo (Q98)
6	—	—	Mochero (MO)	50	Macabi
7	—	—	Arizona (ARI)	50	Trujillo

¹Meters over the sea level (m.o.s.l.)

Pruebas de laboratorio

La datación por radiocarbono se llevó a cabo en el Laboratorio de Geología de Copenhague (Dinamarca) y en los laboratorios Beta Analytic Radiocarbon de Florida (EE.UU.) para las muestras de 'El Brujo' y 'Puerto Pobre', respectivamente. Las inspecciones con microscopio electrónico de barrido de las semillas arqueológicas de maíz se realizaron en los Laboratorios de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad Autónoma de Madrid (España). La extracción de ADN genómico se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la "Universidad Autónoma Chapingo" (México). Las pruebas STR se realizaron en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT (México), siguiendo los procedimientos descritos en los Manuales de Protocolo de Laboratorio (Hoisington et al, 1998).

Aislamiento de ADN genómico de maíz arqueológico y moderno.

La extracción del ADN genómico de las hojas de la raza moderna (2,5 g) y de las semillas arqueológicas (5 g) se realizó según el método Dellaporta (Dellaporta et al, 1983) con algunas modificaciones. Brevemente, se incluye cuatro pasos: i) extracción con fenol para obtener ADN de alta pureza; ii) electroforesis en agarosa

de bajo punto de fusión (muestras arqueológicas) de BDH Laboratory Supplies (Poole, Reino Unido; www.bdh.com) para descartar inhibidores de la PCR según Sambrook y Russell (2001); iii) precipitación con etanol absoluto frío (4°C) en el caso de razas modernas o después de la recuperación de tapones de agarosa para muestras arqueológicas (fusión a 65°C, adición de un volumen de tampón TE, pH 8,0 e incubación a 65°C, adición de un volumen de fenol equilibrado, centrifugación, recuperación de la fase acuosa y precipitación con etanol absoluto); y iv) tres lavados con etanol al 70% (v/v) (muestras arqueológicas) para limpiar aún más el ADN aislado. El ADN se cuantificó leyendo la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro DU-65 de Beckman Coulter (Fullerton, CA, EE. UU.; www.beckmancoulter.com). Las muestras de ADN se almacenaron a 4°C y se diluyeron a 100 ng/μl o 125 ng/μl antes de su uso.

Amplificación por PCR de los marcadores moleculares STR.

La tipificación de STR se llevó a cabo después de la amplificación por PCR, el fraccionamiento por tamaño y la tinción (Hoisington et al, 1998), como se describe a continuación. Se eligieron ocho pares de cebadores de PCR en función de su mayor polimorfismo y ubicación en el genoma del maíz (Tabla 2).

Tabla 2. Marcadores microsatélites probados en siete razas nativas peruanas, dos cultivares mejorados y ocho muestras arqueológicas de maíz (*Zea mays* L.).

Sorting number	Loci names	Allele size (bp)	PCR ¹ (°C)	Repetition pattern (5' => 3')	Forward and reverse primers (5' => 3')
1	<i>bnlg131</i>	< 118	54	(AG) ₁₇	CTCTGCGCTACCTTTCTGAGTC GCGGAATCCTTGTGTTCTTG
2	<i>dup014</i>	118-194	58	(CT) ₃ T (CT) ₆ (CA) ₁₆	AGCAGGTACCACAATGGAG GTGTACATCAAGGTCCAGATTT
3	<i>phi011</i>	110-122	54	GGA	GAGCTTCAGCAAGAGCATCCAG CAACGCGATCGATGTGAGCACA
4	<i>phi046</i>	62-66	54	ACGC	ATCTCGCGAACGTGTGCAGATTCT TCGATCTTTCCCGGAAGTCTGAC
5	<i>phi076</i>	156-168	54	GAGCGG	TTCTTCCGCGGCTTCAATTTGACC GCATCAGGACCCGCAGAGTC
6	<i>phi113</i>	120-284	58	GTCT	GCTCCAGGTCCGAGATGTGA CACAACACATCCAGTGACCAGAGT
7	<i>phi115</i>	93-113	58	TA-ATAC	CTAGTGGGCGAACAACTGGTAAG AAAGAGACCGTGTCAGGATTGCC
8	<i>phi128</i>	100-120	58	AAGCG	TTGCTCGGTATGAAGAAAATAGTCTTT ATCTTGCAACTAGACTGAGGCAACCA

La mezcla de PCR utilizada para amplificar el ADN del maíz arqueológico/moderno (respectivamente) contenía los siguientes componentes en un total de 20 μl de volumen de reacción por tubo: 125/50 ng de ADN, solución tampón de PCR 1X para la enzima ADN polimerasa Taq, 5,0/ MgCl₂ 3,5 mM, 150 μM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2,0/1,5 U de la enzima

ADN polimerasa Taq de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.; www.invitrogen.com), 10% (v/v) glicerol y 0,25 μ M de cada cebador específico de maíz (directo e inverso) de Primer Research Genetics (Huntsville, AL, EE. UU.; www.primerresearch.com). La amplificación se realizó en un Thermal Cycler 480 de Applied Biosystem (Foster City, CA, USA; www.appliedbiosystems.com) con el siguiente perfil de ciclado: un primer paso desnaturalizante (1 min a 93° C); 35 ciclos (1 min desnaturalización a 93° C, 2 min de recocido a "X" °C y 2 min de extensión a 72° C); y un paso final (7 min a 72° C) para ayudar a terminar los amplicones incompletos. La "X" representa la temperatura de hibridación específica utilizada para cada par de cebadores STR, en un rango de 54° C a 58° C (ver Tabla 2), siendo seleccionados con los intervalos térmicos de la Maize Data Base (MaizeDB) en <http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>.

La segregación de amplicones se realizó en geles de agarosa Seakem al 3% (p/v) de BMA (Rockland, MD, EE. UU.; www.bmaproducts.com) para las pruebas preliminares y luego en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 12% (p/v) (13 cm de alto x 14 cm de ancho x 1 mm de espesor). Se utilizaron geles independientes para cada marcador STR. Se colocaron alícuotas de 4,5 μ l de cada producto de PCR en los pocillos de gel hechos con peines de 28 dientes. Se reservaron tres pocillos por gel para los estándares de peso molecular: 'phiX174/HaeIII' para el primer y último pocillo, y '100 pb DNA ladder' de Invitrogen entre los arqueológicos (muestras del lado izquierdo: T1, T4, 513, 518, 519, 520, 525 y 526) y modernos (muestras del lado derecho: Alazán, Arizona, Mochero, Pagaladroga, Huayleño, Paro, Cuzco, CML131 y K64R). La separación se realizó en sistemas de electroforesis vertical AE-6220 de Atto Corporation (Tokio, Japón; www.atto.com). La electroforesis en gel se realizó a 300 V y 95 mA (28,5 W) durante 3 h.

Los amplicones de ADN se visualizaron después de tinción con nitrato de plata al 0,2% (p/v). Los alelos STR se puntuaron visualmente en función de sus tamaños moleculares. Los geles desarrollados se documentaron con una cámara Digital Science 1D de Kodak (Rochester, NY, EE. UU.; www.kodak.com) bajo luz visible.

Procedimientos estadísticos

El análisis de los datos se basó en la puntuación de la banda de ADN (alelo) en los geles (presencia o ausencia de bandas particulares en las fotografías del gel). Se compararon los alelos obtenidos en las diferentes réplicas de amplificación, confirmando sus tamaños esperados con los estándares de peso molecular incluidos en los geles. Los análisis fueron muy restrictivos. Por lo tanto, sólo las bandas claras y consistentes que mostraban los tamaños esperados (movilidad electroforética) en todas las repeticiones y geles se consideraron equivalentes y, por lo tanto, se calificaron. Las bandas de gel correspondientes a los amplicones STR se ingresaron en una matriz de datos binaria básica (BDM) para muestras de maíz tanto arqueológicas como modernas. Esto se logró utilizando la hoja de cálculo Excel de Microsoft (Redmond, WA, EE. UU.; www.microsoft.com), puntuando cero ("0") cuando la banda estaba ausente, uno ("1") cuando estaba presente y una interrogante ("?") cuando era dudoso. Luego, los BDM se transformaron en matrices

de similitud aplicando el coeficiente de similitud de Jaccard: $a/(n-d)$; siendo “a” el número de fragmentos de ADN (bandas de gel) compartidos entre dos genotipos; “n” el número total de bandas polimórficas encontradas después del screening en gel, y “d” el número de bandas faltantes en ambos genotipos (Jaccard, 1908). Esto generó una matriz compuesta de ceros y unos para cada par de cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR. Las columnas representan las muestras analizadas y las filas corresponden a las bandas (alelos) seleccionadas en el rango de peso molecular esperado para los cebadores STR seleccionados. Las diferentes matrices obtenidas para cada par de cebadores se unieron para construir una única, que luego se analizó mediante la aplicación NTedit versión 1.1b (1998) de Applied Biostatistics (Foster City, CA, EE. UU.; www.appliedbiostatistics.com). La matriz de ceros y unos se exportó a la aplicación NTSYSpc versión 2.02i (1998) del mismo fabricante y se transformó posteriormente en una matriz de similitud genética. El patrón de relaciones genotípicas para la matriz de marcadores moleculares se obtuvo aplicando el procedimiento de análisis de conglomerado basado en el Método de Media Aritmética de Grupos de Pares No Ponderados (UPGMA). Finalmente se construyó el dendrograma que muestra las relaciones filogenéticas. Los datos fueron procesados con las aplicaciones NTSYSpc (Rohlf 1997) y Excel.

Resultados

Datación por radiocarbono de colecciones arqueológicas.

La antigüedad (autenticidad) de las antiguas colecciones de maíz Chimú y por ende del ADN aislado de ellas fue confirmada con datación por radiocarbono de muestras representativas de cada emplazamiento. Así, una muestra correspondiente a 'El Brujo' (de 'Huaca Cao Viejo') fue analizada en los Laboratorios de Geología del Museo Nacional de Dinamarca. La edad esperada era 590 ± 70 años (respecto al año 1950). La datación arrojó cifras entre 1.300 a 1.420 años d.C.; es decir hace 640 años, considerando como promedio el año 1.360 d.C.

Otra muestra de Puerto Pobre fue datada en los Laboratorios Beta Analytic de Radiocarbono de Miami. La edad esperada era 440 ± 50 años (respecto al año 1.950). La calibración con 2 sigma arrojó fechas entre 1.415 a 1.520 años d.C. con un 95% de probabilidad; es decir, hace unos 530 años, considerando como promedio el año 1.470 d.C.

Topografía con microscopio electrónico de barrido de semillas ancestrales de maíz Chimú.

Las fotografías correspondientes a la muestra 518 de 'Puerto Pobre' muestran un aspecto limpio y reticulado de la cabeza de la semilla. También existe gran cantidad de granos de almidón provenientes del endospermo, con algunos cuerpos proteicos propios de esta especie (Fig. 3). El aumento es de 1000X, mostrando una buena conservación y la ausencia de microorganismos, lo que respalda el carácter endógeno del ADN aislado.

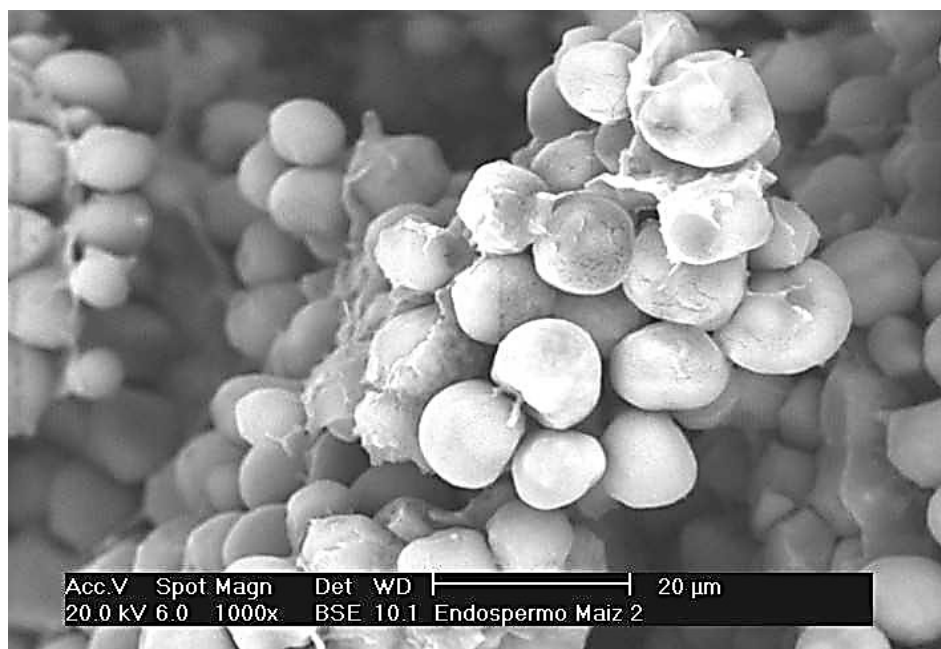


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido. Topografía del endospermo de semillas arqueológicas de maíz Chimú (*Zea mays*). Las muestras se tiñeron al vacío con oro y se amplificaron 1000X.

Aislamiento de ADN genómico de muestras arqueológicas de maíz.

El ADN se aisló de hojas (variedades modernas) o de semillas (maíz arqueológico). Este último mostró buenas señales de banda de 70 a 500 pb en geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con bromuro de etidio después de iluminación UV (Fig. 4). Sin embargo, el ADN del maíz antiguo contenía muchas impurezas (sales, taninos, ácidos húmicos, etc.). Los contaminantes se eliminaron eficazmente segregando el producto de la reacción de PCR mediante electroforesis (como el enfoque de agarosa de bajo punto de fusión descrito en este trabajo) y escindiendo la banda de ADN amplificada de interés. Los contaminantes de color marrón (taninos y ácidos húmicos) exhibieron una migración más lenta que las moléculas de ADN y ARN parcialmente degradadas. Después de la irradiación con luz ultravioleta (UV), dichos contaminantes produjeron una mancha fluorescente verde azulada, claramente diferente y segregada de la fluorescencia naranja rojiza del ADN. Este último se seleccionó, se cortó, se fundió y se sometió a una nueva extracción de ADN. El material recién purificado y cuantificado se diluyó y se utilizó en las reacciones de PCR posteriores, que amplificaron las dianas STR. No en vano, los datos de concentración del ADN reextraído (genotipos antiguos) revelaron que la cantidad y calidad del ADN antiguo que podía aislarse de cada muestra estaba directamente asociada con el grado de conservación de las semillas (cuanto mejor fuera la conservación de las semillas, cuanto más y mejor sea el ADN que se pueda recuperar de ellos).

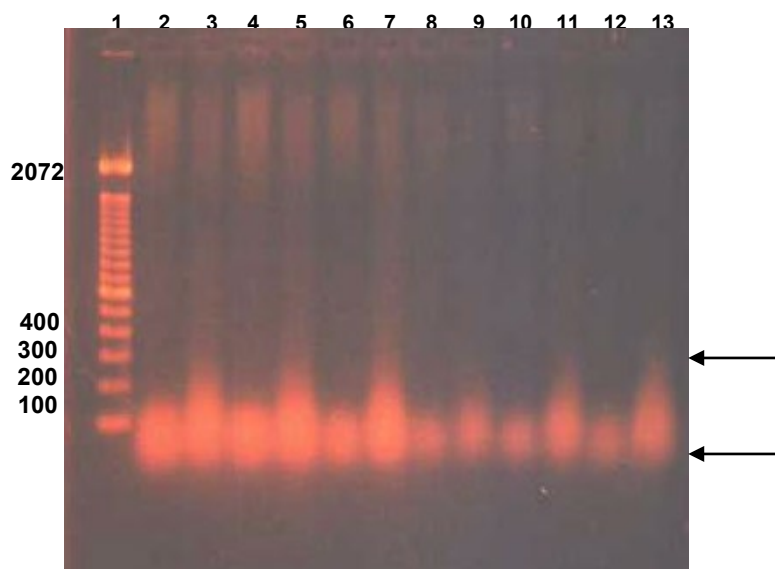


Figura 4. Ácidos nucleicos totales de colecciones arqueológicas de maíz Chimú (*Zea mays*). Las muestras se cargaron en geles de agarosa al 2% (p/v) y se fotografiaron bajo luz ultravioleta, después de la tinción con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de peso molecular en "escalera de 1.000 pb"; carriles 2 a 7: muestras de maíz 'Puerto Pobre'; Carriles 8 a 13: Muestras de 'El Brujo'.

Tipaje STR

Se probaron diferentes condiciones experimentales para optimizar las amplificaciones de STR por PCR. Por ejemplo, se descubrió que la amplificación del ADN del maíz antiguo requería concentraciones más altas de MgCl₂ y Taq ADN polimerasa que las necesarias para las muestras modernas. Curiosamente, tales concentraciones también fueron algo más altas que las reportadas previamente para el ADN del maíz moderno por Hoisington et al. (1998). Por otro lado, las temperaturas de recocido óptimas encontradas en este trabajo (54° C y 58° C) para los ocho pares de cebadores están de acuerdo con los datos publicados en 'MaizeDB', excepto para el par de cebadores bnlg131. Este último amplificó Alazán, CML y K64R, pero no logró amplificar adecuadamente los otros genotipos modernos con un patrón claro y consistente, por lo que se calificó como un signo de interrogación ("¿") en los datos de la matriz (BDM). Cabe señalar que no probamos temperaturas más bajas, lo que podría haber generado resultados positivos para dicho par de cebadores.

Cinco (dup014, phi046, phi128, phi113 y phi115) de los ocho pares de cebadores STR analizados generalmente generaron fragmentos de ADN (alelos) con buena resolución tanto en muestras antiguas como modernas. Las únicas excepciones

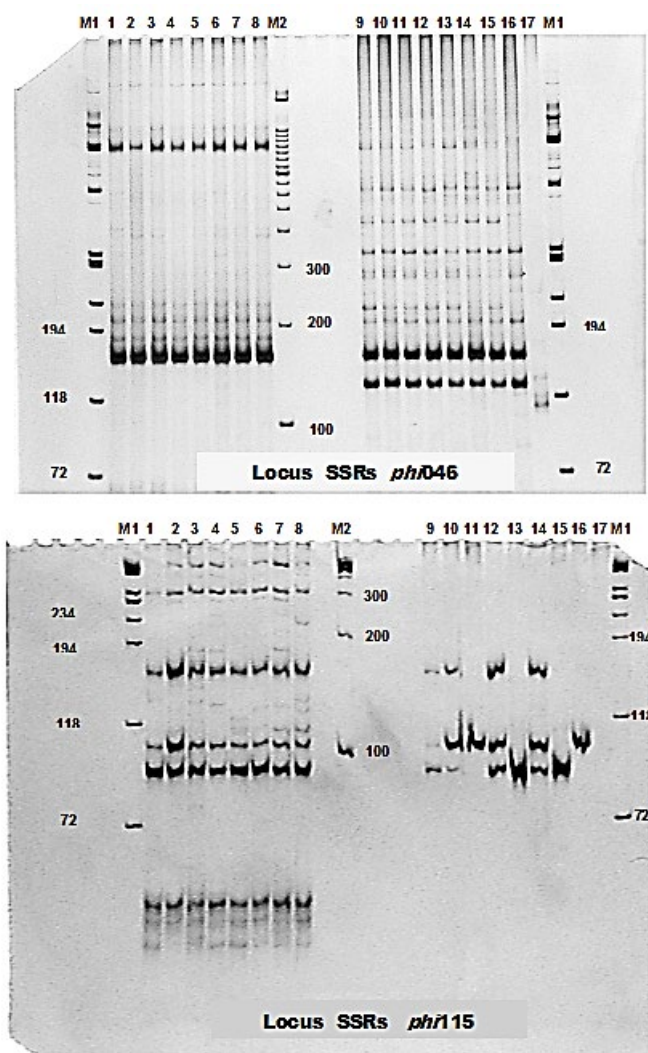


Figura 5. Productos de amplificación por PCR de maíz (*Zea mays*) tanto arqueológico como moderno. El ADN genómico se amplificó utilizando los pares de cebadores STR phi046 y phi115, se segregó en geles de poliacrilamida al 12% (p/v) y se tiñó con nitrato de plata. Carriles M1 y M2: marcadores de peso molecular “phiX174/HaeIII” y “escalera de 100 pb”, respectivamente; carriles 1 a 8: muestras arqueológicas (genotipos T1, T4, 513, 518, 519, 520, 525 y 526, respectivamente); carriles 9 a 17: muestras modernas (genotipos Alazán o ALA, Arizona o ARI, Mochero o MO, Pagaladroga o PAG, Huayleño o HUA, Paro o PAR, Cuzco o CUZ, CML131 o CML & K64R, respectivamente).

fueron dup014 (que amplificó Alazán, pero no generó bandas inequívocas con los otros genotipos modernos), y bnlg131 (como se indicó anteriormente), phi011 y phi076 (que no produjeron ningún ADN amplificado a partir de muestras arqueológicas). Los ocho marcadores STR generaron 23 alelos totales, estando nueve de ellos presentes en las muestras arqueológicas. El número promedio de alelos fue de 2,9 por STR: desde dos alelos para cuatro pares de cebadores (phi046, phi011, phi128 y phi115) hasta seis alelos para el par de cebadores bnlg131. A modo de ejemplo, la Fig. 5 muestra los resultados obtenidos con los cebadores phi046 y phi115 tanto en muestras arqueológicas como modernas.

Table 3. Analysis of eight STR markers in eight archaeological samples, seven modern native breeds and two improved cultivars of corn (*Zea mays* L.).

Sample	Total bands (alleles)	Total polymorphic Bands	Average of polymorphic alleles	Average of genetic similarity
Archaeological	9	0	0	1
Modern	19	97	2.71	0.43
Total	23	21	2.90 (2 - 6)	0.44

Las muestras arqueológicas mostraron un valor de cero (es decir, monomórficas), mientras que las muestras modernas tuvieron una puntuación de 2,71 (Tabla 3). El promedio de similitud genética de ambas muestras se calculó con la aplicación NTSYSpc.

Los amplicones generados por cada par de cebadores STR de maíz utilizados en este trabajo tienen un rango de tamaño definido y conocido (Tabla 2), lo que reduce el riesgo de asignaciones falsas. Además, las imágenes de las bandas de amplicones correspondientes a ellos están disponibles en MaizeDB en <<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>>.

Matriz de similitud genética

El rango de distribución de las 153 cifras de la matriz de similitud genética para los marcadores STR (Tabla 4) abarcó valores de 0,08 a 1,00, con una media de 0,44 para toda la muestra. El rango de distribución de las muestras modernas varió de 0,08 a 0,69, con un promedio de 0,43 y mostrando un 60% de valores menores a 0,50. Por otro lado, como se indicó anteriormente, las muestras arqueológicas eran todas iguales; es decir, mostró el mismo valor de similitud genética (1).

Tabla 4. Matriz de similitud genética (coeficiente de Jaccard) entre las ocho muestras arqueológicas, siete razas nativas modernas y dos cultivares mejorados de maíz (*Zea mays* L.).

	Archaeological com								Modem corn ¹								
	T1	T4	513	518	519	520	525	226	ALA	ARI	MO	PAG	HUA	PAR	CUZ	CML	K64R
Archaeological corn	T1	1															
	T4	1	1														
	513	1	1	1													
	518	1	1	1	1												
	519	1	1	1	1	1											
	520	1	1	1	1	1	1										
	525	1	1	1	1	1	1	1									
	526	1	1	1	1	1	1	1	1								
Modem corn	ALA	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	1							
	ARI	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.33	1							
	MO	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.55	0.60	1						
	PAG	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.57	0.54	0.69	1					
	HUA	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.30	0.50	0.27	0.45	1				
	PAR	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.60	0.40	0.60	0.64	0.50	1			
	CUZ	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.33	0.33	0.27	0.45	0.67	0.57	1		
	CML	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.53	0.67	0.60	0.50	0.30	0.50	0.20	1	
K64R	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.46	0.44	0.67	0.46	0.22	0.63	0.38	0.50	1	

Dendrograma y patrón de agrupamiento.

La Fig. 6 muestra el patrón de relaciones genéticas de la muestra completa con ocho marcadores polimórficos STR. El análisis de agrupamiento se realizó a 0,45 del intervalo del coeficiente de similitud de Jaccard. Las dos muestras (arqueológica y moderna) estaban claramente separadas en dos grupos. Como se indicó anteriormente, todos los genotipos arqueológicos exhibieron el mismo valor de similitud genética. Por otro lado, los genotipos de la muestra moderna se agruparon en tres subgrupos (A, B y C), que contenían entre dos y cinco genotipos cada uno. Así, A quedó conformado por cinco genotipos: 'Alazán' (ALA), 'Mochero' (MO), 'Pagaladroga' (PAG), 'Paro' (PAR) y una línea mejorada (K64R). Las razas de la costa norte ("Mochero" y "Pagaladroga") compartieron un promedio de similitud genética de 0,68. El subgrupo B incluyó dos genotipos: 'Arizona' (ARI) y CML123 (CML), que fue la otra línea mejorada. Exhibieron un promedio de similitud genética de 0,66. Finalmente, el subgrupo C estuvo constituido por dos genotipos: 'Huayleño' (HUA) y 'Cuzco' (CUZ), con un promedio de similitud genética de 0,66. Este dendrograma muestra claramente que las tres razas principales de la costa norte ('Alazán', 'Pagaladroga' y 'Mochero') comparten el mismo grupo. Esto está de acuerdo con su proximidad geográfica y respalda su similitud genética. Asimismo, 'Alazán' (ALA) es la raza más relacionada (genéticamente) con los genotipos arqueológicos del maíz.

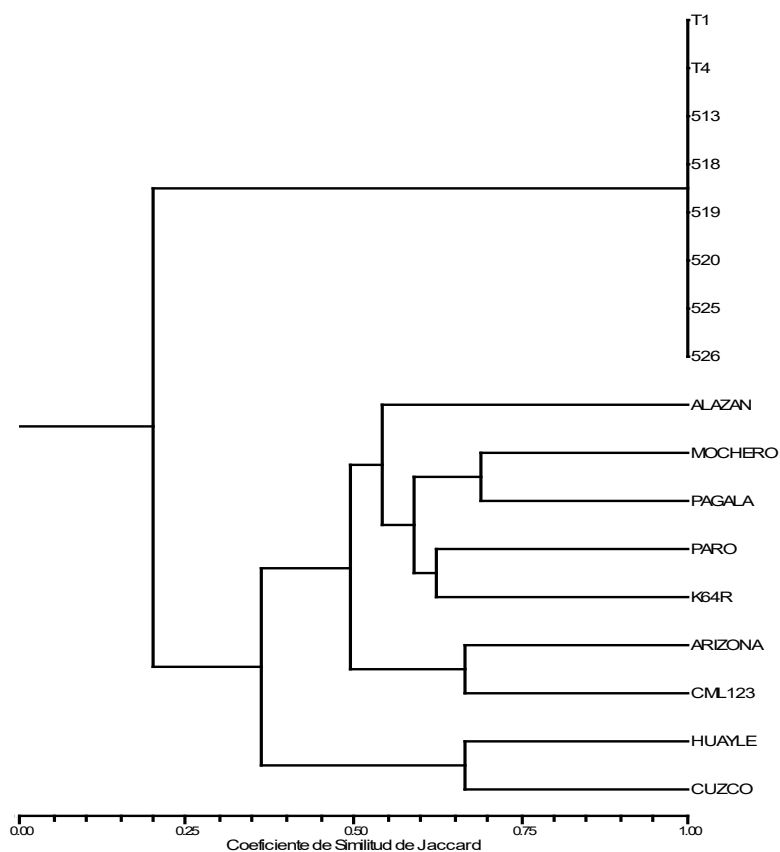


Figura 6. Árbol filogenético. El dendrograma se construyó con marcadores STR utilizando el algoritmo UPGMA. Muestra los parentescos de diversidad genética de ocho muestras arqueológicas Chimú, siete razas nativas modernas y dos cultivares mejorados de maíz (*Zea mays*).

Discusión

Descripción arqueobotánica de las colecciones de maíz Chimú

Los datos obtenidos en este trabajo han permitido afiliar algunos ejemplares arqueológicos de maíz a protorazas que estuvieron presentes en la costa norte prehispánica del Perú; particularmente los que se cultivaron durante el período Chimú, tanto en el valle de Chicama como en el de Casma. Las mazorcas de 'Puerto Pobre' mostraron rasgos típicos tanto de las protorazas de la costa norte como de las protorazas intermedias de la costa norte con introgresiones de razas andinas. Las semillas de maíz aisladas de las muestras de 'El Brujo' pertenecerían a razas costeras; posiblemente 'Proto-Alazán' y 'Proto-Pagaladroga', lo que concuerda con Grobman et al, (1961) y Sevilla (1994). Los cultivares de maíz de la costa norte peruana hace 1.200 años son conocidos como protoformas de la raza 'Alazán', con mazorcas cilíndricas y cortas que muestran 10 hilos de granos. Aún existen dudas sobre el 'Proto-Alazán' arqueológico en relación con las otras dos razas distribuidas simpátricamente ('Proto-Mochero' y 'Proto-Pagaladroga'), debido a los rasgos intermedios de la mazorca.

Aislamiento, grado de conservación y autenticidad del ADN del maíz Chimú.

El aislamiento de ácidos nucleicos de alto peso molecular a partir de muestras de semillas antiguas no garantiza la ausencia de contaminación microbiana. En realidad, podría ser más bien un indicativo de dicha contaminación. Así, el aislamiento de ácidos nucleicos parcialmente degradados de las colecciones de maíz Chimú es evidencia de que se ha conservado al menos parte del material genético original de la semilla arqueológica.

Otros estudios también han reportado el aislamiento de ADN parcialmente despolimerizado de maíz arqueológico encontrado en la costa norte del Perú. Un informe trataba sobre semillas mal conservadas de Sipán (cultura Moche; aproximadamente 500 años d.C.) (Rollo et al, 1991). Otro estudio encontró ácidos nucleicos de muy bajo peso molecular con ADN altamente degradado en embriones individuales de muestras arqueológicas de maíz de Casma (costa norte del departamento de Ancash). En algunos casos más, algunos embriones pequeños se combinaron en una muestra mixta para tener un peso mayor y así generar una concentración de ADN más alta, que osciló entre 0,5 y 1,0 g (Bird et al, 1995b). Cabe mencionar que Sipán se encuentra a unos 300 km de los sitios donde se recolectaron las muestras de maíz Chimú (utilizadas en nuestro trabajo). Los tejidos y estructuras duros (como los de las semillas) suelen estar mejor conservados que los tejidos parenquimáticos. Esto se debe a la escasez de agua y enzimas en los primeros, así como a su mayor protección mecánica (Hermann y Hummel, 1994).

Por otro lado, las condiciones abióticas que pueden contribuir a prolongar la conservación han sido menos estudiadas. Sin embargo, es probable que la aridez de la costa norte del Perú haya jugado un papel favorable para preservar su material arqueobotánico. Las colecciones de maíz Chimú pertenecen a sitios costeros (Fig. 1) con extrema aridez, conservándose en ocasiones como mazorcas completas. Tal es el caso de la muestra de "Puerto Pobre" (Fig. 2). Esto probablemente favorece la protección del embrión, aumentando las probabilidades de extraer ADN menos degradado. Pääbo (1985, 1989) ha sugerido que se requiere una deshidratación

rápida para mejorar la preservación del ADN, debido a la susceptibilidad de dichas moléculas a la hidrólisis enzimática. Además, la deshidratación puede contribuir a la conservación diferencial de algunos orgánulos en los tejidos vegetales. Además, se espera que la deshidratación reduzca las actividades de las proteasas endógenas en relación con las propiedades de senescencia de las hojas. Sin embargo, algunos tejidos antiguos que contenían ADN se conservaron completamente hidratados (Golenberg et al, 1990; Hagelberg y Clegg, 1991).

Otra cuestión importante que afecta a la conservación y autenticidad de los ácidos nucleicos aislados de muestras antiguas es la posible contaminación y actividad microbiana. Los microorganismos pueden degradar el material orgánico en general y los ácidos nucleicos en particular. Por lo tanto, se recomienda un estudio de microscopía electrónica de barrido (MEB) para evaluar la posible conservación de las muestras y, por tanto, su proporción esperada de ADN antiguo (Hermann y Hummel, 1994). Las muestras de maíz Chimú analizadas en el presente trabajo mostraron una buena conservación y fueron sometidas a una exploración topográfica de la superficie de la cabeza y el endospermo mediante MEB. Como se muestra en la Fig. 3, no se detectaron microorganismos como bacterias y hongos.

Además, los granos de almidón y los cuerpos proteicos exhibieron buena conservación y morfología. Probablemente esto se deba a la rápida deshidratación a la que son sometidas las muestras arqueológicas de la costa norte del Perú a lo largo de su historia tafonómica, como se indicó anteriormente. La causa de la sequedad serían las abundantes sales encontradas en los ambientes arqueológicos de 'El Brujo' y 'Puerto Pobre', junto con el limitado índice de precipitaciones, que deberían limitar la proliferación microbiana. Por tanto, el estudio microelectrónico apoya la naturaleza endógena del ADN aislado de las semillas de maíz utilizadas en nuestro trabajo. Análisis similares se realizaron con semillas de maíz de un entierro de la cultura Wari (800 años d.C.), mostrando un endospermo bien conservado con granos de almidón, sin evidencia de contaminación por bacterias y hongos (Rollo et al, 1994a). Por lo tanto, esta asepsia parece ser una característica común del material arqueobotánico de maíz encontrado en la costa norte del Perú.

Otro factor más que se considera para respaldar la autenticidad del ADN aislado es la inclusión de réplicas independientes para cada muestra. La concordancia y consistencia de los resultados generados en este trabajo con los diferentes extractos respaldaron aún más la autenticidad del material utilizado y la confiabilidad del enfoque experimental.

Por último, pero no menos importante, quizás el criterio de autenticidad más importante para el ADN aislado de las colecciones arqueológicas de maíz utilizadas en este trabajo fue la datación por radiocarbono, que confirmó la antigüedad de las semillas de maíz y, por tanto, la antigüedad de su ADN, como se informa anteriormente.

Aislamiento y amplificación de ADN de maíz arqueológico y moderno

Los ácidos nucleicos totales aislados de las colecciones de maíz antiguo se muestran en la Fig. 4. Además de la contaminación con ADN exógeno, otro problema potencial cuando se trata de ADN antiguo es la posible presencia de compuestos co-precipitados no deseados como polisacáridos, taninos y ácidos húmicos. Estas últimas son sustancias que se originan en el suelo y que pueden unirse a la semilla durante su historia tafonómica. Se pueden reconocer por el color pardusco del ADN aislado de maíz arqueológico y porque generan una fluorescencia verde azulada en geles de agarosa bajo luz ultravioleta. Dicho material fluorescente también puede contener sulfuros y tiene una movilidad electroforética en geles de agarosa equivalente a fragmentos de ADNbc de aproximadamente 600 pb. Esos productos químicos pueden co-purificarse con el ADN y así inhibir la amplificación enzimática del ADN mediante PCR.

Los primeros ensayos de amplificación por PCR realizados en este trabajo no lograron amplificar las muestras de ADN arqueológicas. Probablemente esto se debió a la presencia de ácidos húmicos (conocidos inhibidores de la reacción de PCR). Realizamos 10 pruebas de PCR con ADN tan antiguo (antes de eliminar los supuestos inhibidores de la PCR) utilizando cebadores STR específicos para el maíz moderno. Estos ensayos se llevaron a cabo con ADN diluido 1:50 y 1:100 veces, para intentar suprimir o reducir el supuesto efecto inhibitorio sobre la PCR como indica Golenberg (1991). En todos los casos el resultado fue negativo; es decir, no se generó ningún amplicón. Por lo tanto, purificamos aún más el ADN previamente aislado (que oscila entre 70 y 500 pb), mediante segregación en electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión. Detectamos mejores señales de ADN en las muestras de 'Puerto Pobre' (posiblemente porque provenían de mazorcas completas) y bandas o señales menos intensas en las de 'El Brujo' (de granos de semillas aisladas). Los tapones de gel que contenían la fluorescencia anaranjada-rojiza (es decir, el ADN) de cada muestra antigua se cortaron, se fundieron y se sometieron a extracción con fenol para intentar recuperar los ácidos nucleicos libres de inhibidores. Las muestras no se dializaron más, ya que el enfoque anterior generó resultados de amplificación satisfactorios.

Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos adicionales en los que se utilizaron muestras extrapurificadas (libres de inhibidores) en reacciones de amplificación por PCR con el par de cebadores STR dup014 de maíz. Además, aumentamos las concentraciones de $MgCl_2$ y Taq ADN polimerasa recomendadas por Hoisington et al. (1998) para ADN moderno, obteniendo las mejores amplificaciones con $MgCl_2$ 5.0 mM y Taq 2.0 U. También se modificaron las concentraciones para las muestras de maíz moderno: 3,5 mM $MgCl_2$ y 1,5 U Taq. Las concentraciones óptimas de ADN en la amplificación STR con cebadores dup014 fueron 125 ng (ADN antiguo) o 50 ng (ADN moderno). Nuestro protocolo de amplificación por ciclos de ADN mediante PCR generó resultados positivos tanto en ADN moderno como antiguo. Otros autores como Bird et al. (1995b) han utilizado diferentes perfiles para amplificar el ADN del maíz arqueológico: 30 ciclos cortos (94° C/30 s, 61° C/50 s y 72° C/2 min). Goloubinoff et al. utilizaron un perfil similar de 40 ciclos cortos (93 °C/40 s, 55 °C/1

min y 72 °C/1,5 min). (1993) para ampliar el maíz arqueológico de Perú y Chile. Por lo tanto, la eliminación de los inhibidores de la PCR y la presencia de concentraciones apropiadas de MgCl² y Taq ADN polimerasa son parámetros críticos para lograr la amplificación enzimática del ADN antiguo mediante PCR.

El diseño de los cebadores también es de suma importancia. Como ejemplo, los pares de cebadores bnlg131 y dup014 amplificaron bien algunos genotipos modernos, pero no lograron amplificar otros, como se indicó anteriormente. Esto puede indicar un diseño de cebador subóptimo probablemente relacionado con polimorfismos (como SNP) en sitios flanqueantes de STR de maíz antiguo, particularmente en el extremo 3' de los objetivos de recocido. Este problema podría aliviarse o superarse reduciendo la temperatura de recocido y/o rediseñando el o los cebadores involucrados.

Las condiciones de PCR anteriores para amplificar el ADN antiguo (particularmente las altas concentraciones de MgCl² y Taq) pueden reducir la fidelidad de la ADN polimerasa Taq. De hecho, se ha descrito que, dependiendo de las condiciones experimentales, dicha enzima puede generar una mutación por cada 250-b polimerizado (Innis et al., 1988). Esta tasa de error podría incluso aumentar en el caso del ADN antiguo y dañado (Pääbo et al, 1990). Sin embargo, estos problemas sólo son importantes si los amplicones se clonan y secuencian adicionalmente (ya que, en tal caso, generalmente se recoge y amplifica una sola molécula en el huésped bacteriano). Por lo tanto, si se secuencian los amplicones, se recomienda secuenciarlos en sentido directo e inverso a partir de tres clones independientes o, alternativamente, secuenciar directamente en ambas direcciones los productos del amplicón sin clonar, diluyendo así eficazmente las mutaciones presentes y generando una verdadera lectura de consenso (Pääbo et al, 1989).

Análisis del polimorfismo STR

Los productos de amplificación generados utilizando los ocho pares de cebadores STR específicos de maíz con las ocho muestras de maíz arqueológico y las nueve muestras de razas modernas se visualizaron en geles de poliacrilamida al 12% (p/v) después de electroforesis y tinción con nitrato de plata. Esto permitió una mejor separación de los alelos y, por tanto, una puntuación más precisa de las bandas polimórficas. Los ocho pares de cebadores analizados amplificaron las muestras modernas, pero sólo cinco de ellos amplificaron loci STR del ADN de maíz antiguo. El análisis se realizó en condiciones muy restrictivas. Por lo tanto, las bandas no bien definidas no fueron consideradas para el análisis final.

Pueden surgir bandas inespecíficas de mayor peso molecular a partir de ADN antiguo debido a las condiciones menos astringentes comúnmente utilizadas en tales amplificaciones, incluidas concentraciones más altas de reactivos (como MgCl² y Taq ADN polimerasa) y temperaturas de hibridación más bajas. Pero también pueden surgir debido a diferencias en el ADN genómico diana. Por tanto, se pueden generar diferentes tamaños de amplicones a partir de diferentes genotipos; particularmente de los arqueológicos, lo que puede complicar su

asignación y análisis. Por esta razón, generalmente se asocia una variedad de tamaños de amplicones con cada par de cebadores (Tabla 2). Como hemos encontrado, tal rango en Maize DB (razas modernas de maíz y genotipos nativos mexicanos) no siempre se corresponde con los amplicones obtenidos con el maíz antiguo del Perú analizado en el presente trabajo. La secuenciación de los diferentes amplicones generados en todas las muestras modernas, nativas y antiguas podría confirmar aún más estas divergencias.

El promedio de alelos polimórficos encontrados mediante el genotipado STR fue bastante bajo (2,9). La razón es doble: en primer lugar, la puntuación de la banda era muy conservadora y restrictiva como se indicó anteriormente; y segundo, todas las muestras arqueológicas eran monomorfas.

Otros autores han comparado la tipificación STR de muestras de maíz antiguas y modernas. Descubrieron que, mientras que algunas muestras generaban bandas claras para muchos pares de cebadores STR, otras muestras no producían resultados positivos. Además, dichos autores advirtieron que la variabilidad encontrada en los especímenes antiguos no era consistente ni repetitiva. Como consecuencia, no pudieron definir adecuadamente la estructura genética de las poblaciones antiguas de maíz en la costa norte del Perú (Bird et al., 1995a, b). Se han publicado resultados similares para el ADN de semillas de maíz arqueológico; aunque fueron genéticamente informativos, no mostraron polimorfismo entre muestras antiguas y modernas (Rollo et al, 1994a, b). Se ha propuesto que, en general, los polimorfismos basados tanto en el número de copias como en la variación de secuencia en las regiones del ADN nuclear podrían ser un mejor enfoque que los polimorfismos basados únicamente en la variación de secuencia para estudios genéticos diacrónicos de semillas antiguas (Rollo et al, 1994b).

Parentesco entre las muestras analizadas

El número total de secuencias STR en el maíz y otras especies de plantas es sorprendentemente alto (Senior y Heun, 1993). Así, se ha considerado que el genoma del maíz puede contener alrededor de 104 – 105 copias de los microsatélites (GT)_n y (AG)_n (Condit y Hubbel, 1991); teniendo aproximadamente 5 x 10³ y 3 x 10⁵ copias para microsatélites (AC)_n y (AG)_n, respectivamente (Cregan, 1992).

La inestabilidad inherente de las secuencias STR las hace extremadamente útiles para estudios tanto evolutivos como genéticos. Una tasa de mutación tan alta se debe principalmente a cambios en el número de copias de la unidad estructural básica o patrón de bases que se repite en tándem, formando el microsatélite (p. ej., GT). Sin embargo, no todos los STR son igualmente inestables, simplemente porque no todos son igualmente propensos a los procesos de mutación (Eisen, 1999).

Hemos analizado ocho secuencias STR de maíz en función de la ubicación de su genoma y su alto nivel de polimorfismo, como se describe en Maize DB. Las

consideraciones teóricas indican que es necesario estudiar varios loci para establecer relaciones filogenéticas confiables. Además, se recomienda analizar entre 30 y 50 STR para estudios evolutivos. Esto permitiría clasificar las muestras arqueológicas de maíz en clusters con mayor exactitud y precisión, generando así mejores relaciones filogenéticas (Smith y Helentjaris, 1994).

La matriz de similitud genética generada en este trabajo (Tabla 4) demuestra que los marcadores STR utilizados varían de 0,08 a 1, con un promedio de 0,44 para la muestra completa. Como se deduce de dicho valor de similitud de 1, y como se muestra en el patrón de agrupamiento del dendrograma, las muestras arqueológicas eran monomórficas (Fig. 6). Es posible que la antigua población de maíz de la que se obtuvieron las muestras fuera bastante homocigótica. Esto no es sorprendente, ya que, aunque el maíz es una planta alógama, es posible fijar todos los loci evaluados mediante eventos de deriva genética, que podrían acentuarse aún más en poblaciones pequeñas. Así, las poblaciones analizadas podrían haber sido fuente de alimento para sólo unas pocas familias. Más importante aún, probablemente mantuvieron su variedad de maíz guardando solo unas pocas mazorcas para la siguiente siembra, en lugar de agitar todas las mazorcas de la cosecha y luego elegir los mejores granos como semillas de la próxima generación.

Este último enfoque sería el mejor para mantener e incluso aumentar la variabilidad genética de la población a lo largo de generaciones. Por el contrario, el primer método favorecería la consanguinidad y reduciría drásticamente la variabilidad genética y la heterosis de la población de maíz tras unas pocas generaciones de práctica. Curiosamente, este procedimiento “antiguo y endogámico” se puede observar aún hoy entre los agricultores de los pueblos cercanos a los sitios arqueológicos muestreados. De hecho, almacenan sus mazorcas dentro de arena de río para protegerlas de insectos y otras plagas, optimizando la viabilidad de las semillas. Evidentemente no son conscientes de la endogamia y falta de variabilidad genética que representa tal procedimiento.

La práctica endogámica descrita anteriormente implicaría que muy pocos individuos contribuirían a cada nueva generación de maíz. Por lo tanto, el verdadero tamaño (genético) de la población se reduciría con cada generación de maíz en la que dichos grupos humanos de agricultores permanecerían aislados (es decir, sin intercambio de germoplasma de maíz con otros humanos). En relación con esto, cabe destacar que la distancia entre los dos sitios arqueológicos (‘El Brujo’ y ‘Puerto Pobre’) de donde procedieron las muestras de maíz antiguo evaluadas en este trabajo es de apenas 220 km. Además, la datación por radiocarbono asignó 440 ± 50 años a las muestras de Puerto Pobre; es decir, entre 1.415 y 1.520 años d.C. Por otro lado, los ejemplares de ‘El Brujo’ tienen una antigüedad de 590 ± 70 años; es decir, entre 1.300 y 1.420 años d.C. En consecuencia, estos hechos sugieren que en algún momento de su historia hubo contactos entre los diferentes valles, los cuales fueron incorporados al estado Chimú luego de diferentes etapas de expansión de este imperio (Keatinge, 1974). Esto puede explicar dicho intercambio de germoplasma de maíz, como lo demostró Bird (1990). Para respaldar este razonamiento, los registros escritos del cronista español informan que el maíz se

cosechó en el valle de Chicama ('El Brujo') y luego se llevó a 'Huanchaco' (valle de Moche). Desde allí se enviaba en embarcaciones marítimas a una pequeña bahía de pescadores conocida como "Los Chimos" (cerca de Casma y "Puerto Pobre"), donde era un bien muy valorado (Cristóbal Campana, 2001 comunicación personal). Este intercambio histórico de germoplasma de maíz entre ambos sitios arqueológicos reforzaría la hipótesis de que ambas muestras de ADN antiguas habían tenido un conjunto común de genes estabilizados, lo que podría ponerse a prueba analizando más marcadores STR.

Por otro lado, existen evidencias de que la raza de maíz conocida como "Cuzco" ha tenido influencia significativa en los andes (incluyendo varios cultivares de la costa y sierra que exhiben un grano grande y un número bajo de hileras estrechas). Además, se ha demostrado la presencia de la raza Cuzco en la costa peruana, tanto como representaciones pictóricas en la cerámica de las culturas Mochica y Chimú, como por los cronistas españoles que escribieron frecuentemente sobre dicha raza de maíz (Sevilla, 1994). Sin embargo, no hemos detectado tales evidencias en nuestro estudio STR.

El dendrograma basado en la UPGMA (Fig. 6) también demuestra que la raza 'Cuzco' se agrupa (grupo 'C') con la raza 'Huayleño', segregada del grupo 'A' formado por las tres razas de la costa norte ('Alazán', 'Mochero' y 'Pagaladroga'). Resultados similares también se encontraron en un estudio de caracterización molecular de las razas modernas de maíz peruano utilizando 90 marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP); la raza 'Cuzco' no se agrupaba con ninguna otra raza de la costa norte (Blas et al., 1998). En relación con el grupo 'A' (Fig. 6), y basándose en datos morfológicos y citogenéticos, Grobman et al, (1961) propusieron que el 'Proto-Alazán' era un producto evolutivo de hibridaciones tempranas entre 'Proto-Mochero' y 'Proto-Pagaladroga'. Sin embargo, también se ha propuesto que el 'Proto-Mochero' está relacionado tanto con el 'Huachano' como con el 'Pardo', que son razas de la costa sur y que muy probablemente podrían tener relaciones con el maíz 'Puerto Pobre', basándose en su ubicación intermedia en la costa peruana.

Actualmente, las razas costeras del norte como 'Mochero', 'Alazán' y 'Pagaladroga' tienen una distribución limitada en los departamentos de la costa norte de 'La Libertad', Lambayeque y Piura, a elevaciones inferiores a los 50 m sobre el nivel del mar (msnm). En la costa norte, la variedad de maíz 'Mochero' se utiliza secundariamente (después de 'Alazán') como materia prima para la elaboración de la chicha, una bebida fermentada local (Manrique, 1997).

Existen evidencias de la existencia del 'Mochero' como una raza diferente ('Proto-Mochero) en épocas prehistóricas y en la misma zona donde se encuentra actualmente. Sin duda, 'Mochero' es descendiente directo del palomero temprano denominado 'Confite lqueño', que crecía en la costa con hibridaciones muy limitadas que precedieron la formación de este tipo de maíz. También son muy probables las hibridaciones entre 'Mochero' y 'Pagaladroga' (otra raza costera). Por lo tanto, algunas líneas endogámicas derivadas de 'Mochero' exhiben mazorcas típicas

parecidas a 'Pagaladroga'. 'Mochero' también está relacionado con un complejo de razas harinosas similares, ampliamente distribuidas a lo largo de toda la costa peruana (Grobman et al, 1961).

Como se indicó anteriormente, la otra raza de la costa norte es la 'Pagaladroga', distribuida en los valles desde Trujillo hasta Piura. Hoy en día está casi extinto, pero todavía se puede encontrar en algunas granjas, creciendo en lotes mixtos con 'Alazán'; particularmente en la pequeña área de Pueblos en la ribera extremadamente árida del valle de 'La Leche', en el lado norte del Departamento de Lambayeque. Probablemente, esta raza estuvo ampliamente distribuida (como 'Proto-Pagaladroga') en la costa norte y central del Perú, durante los períodos Formativo (Cupisnique y Salinar) y Clásico (Moche y Chimú). La 'Pagaladroga' derivó en la costa norte peruana de un ancestro similar al actual 'Confite Puntigudo'. Es muy probable que tuviera el pericarpio rojo, como lo exhiben los ejemplares de maíz prehispánico. Esta raza también tiene relaciones filogenéticas muy estrechas con el 'Confite Iqueño', ancestro de la raza 'Mochero'. Por otro lado, es posible que 'Confite Puntigudo' se hibridara con el ancestro de 'Mochero', y que la descendencia resultante fuera 'Pagaladroga', la otra raza de la costa norte (Grobman et al, 1961). No pudimos evaluar el 'Confite Puntigudo', ya que las colecciones activas de dicha raza se agotaron en el germoplasma de maíz del CIMMYT.

Estas relaciones genéticas entre las dos protorazas de la costa norte ('Mochero' y 'Pagaladroga') con 'Confite Puntigudo', podrían representar una estrategia eficiente para exhibir más rápidamente el fenotipo de las mazorcas Chimú costeras, al cruzarlas con especímenes de 'Puerto Pobre' (Fig. 2, 7-525-PP), que muestran granos imbricados y acuminados. Sin embargo, también existe la posibilidad de un cruce con otro maíz andino como el 'Paro' (Departamento de Apurímac), que exhibe mayor similitud genética con las razas costeras (Grobman et al, 1961). De hecho, existen evidencias morfológicas de una fuerte introgresión de razas andinas en la muestra de 'Puerto Pobre', aunque la cronología no está clara. Sin embargo, esas evidencias morfológicas no han sido confirmadas con estudios moleculares. Así, las protoformas costeras anteriormente señaladas siguen manteniendo su uniformidad genética, aunque su genoma había experimentado algún tipo de introgresión por parte de germoplasmas de otras razas en distintos momentos de su historia evolutiva.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las siguientes personas: Suketoshi Taba (Gerente del Banco de Germoplasma de Maíz y Trigo, CIMMYT), Mireille Khairallah, Marilyn Warburton, Bacilissa Luna Garrido, Margarita Crosby e Isabel Almanza (CIMMYT). También estamos en deuda con Luis Morett Alatorre, Ernestina Valádez Moctezuma, Ricardo Gaspar Hernández, María Elisa Alvarado y Augusto Cámara Motta ("Universidad Autónoma Chapingo", México), así como con Araceli Montiel y Mario Herrera ("Universidad de Veracruz", México), Jonathan D. Kent (Metropolitan State College of Denver, CO, EE. UU.), Arturo Morales y Eufrosia Roselló ("Universidad Autónoma de Madrid", España), y Eduardo Achútegui Giraldo ("Universidad Nacional de Trujillo", Perú). Esta investigación contó con el apoyo de los siguientes centros e instituciones: "Centro de Biotecnología Aplicada, Laboratorio de Genética Molecular Aplicada y Banco de Germoplasma de Maíz, Centro Internacional

de Mejoramiento de Maíz y Trigo” (CIMMYT, México); “Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Autónoma Chapingo” y “Museo Nacional de Agricultura Prehispánica” (México).

Referencias bibliográficas

Bird R (1978): Archaeological maize from Peru. *Maize Genetics Cooperation News Letter* 52: 90-92.

Bird R (1979): The evolution of maize: a new model for the early stages. *Maize Genetics Cooperation News Letter* 53: 53-54.

Bird R (1980): Maize evolution from 500 B.C. to the present. *Biotropica* 12: 30-41.

Bird R (1985): Ancient tiny cobs and the evolution of Zea. *Maize Genetics Cooperation News Letter* 59: 43.

Bird R (1989): Maize, man and vegetation in north-central Peru. Pp. 447-468. Bock JH and Linhart YB (eds.) *The evolutionary ecology of Plants*. Westview Press, Boulder, CO (EUA).

Bird R (1990): What are chances of finding maize in Peru dating before 1000 B.C? Reply to Bonavía and Grobman. *American Antiquity* 55: 828-840.

Bird R (1994): Manual for the measurement of maize cobs. Pp. 5-22. Johannessen S and Hastorf CA (eds.) *Corn and culture in the Prehistoric New World*. Westview Press. Boulder, CO (EUA).

Bird R, Bird J (1980): Gallinazo maize from the Chicama valley, Peru. *American Antiquity* 45: 325-332.

Bird R, Bohorova N, González de León D, Hoisington D (1995a): Old maize and ancient DNA. *Maize Genetics Cooperation News Letter* 69: 99-100.

Bird R, Bohorova N, Gonzalez de León D, Hoisington D (1995b): New Life for Ancient Seeds Projects. Final report in conjunctions with ARQUEOBIOS supported by DANIDA. “Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo”. Pp. 26.

Blas R, Ribout J, Sevilla R, Chura J (1998): Avances de caracterización molecular de razas de maíz peruanas. *Informe Técnico presentado al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo* (CIMMYT), 40 p.

- Bonavía D (1982): *Precerámico Peruano. Los Gavilanes. Mar, Desierto y Oasis en la Historia del Hombre*. Corporación Financiera de Desarrollo, S. A. COFIDE, Instituto Arqueológico Alemán. Lima (Peru).
- Bonavía D, Grobman A (1978): El origen del maíz andino. Pp. 82-91. H. Trimborn and U. Oberem (eds.) *Amerikanistische Studien I. Festschrift for H. Trimborn I* Collectaneu Instituti Anthropos 20, Berlin (Germany).
- Condit R, Hubbel SP (1991): Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34:66-71.
- Cregan PB (1992): Simple Sequence repeat DNA Length Polymorphism. *Probe* 34:18-22.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983): A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Report* 4:19-21.
- Doebley JF (1994): Morphology, molecules and maize. Pp. 101-112. En: Johannessen, S. and Hastorf, C. A. (eds.) *Corn and Culture in the Prehistoric New World*. Westview Press, Boulder, CO (EUA).
- Dunn ME (1979): Ceramics depictions of maize: a basis for classification of prehistoric races. *American Antiquity* 44: 757-774.
- Eisen JA (1999): Mechanistic basis for microsatellite instability. Pp. 34-48. Goldstein DB & Schlottere C (eds.) *Microsatellite Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford (RU).
- Engel FA (1987): *De las begonias al maíz. Vida y Producción en el Perú Antiguo*. Centro de Investigaciones de Zonas Áridas (CIZA), Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru).
- Galinat WC (1970): The cupule and its role in the origin and evolution of maize. *Bulletin* 565, Massachusetts Agricultural Experiment Station, University of Massachusetts, Amherst (EUA).
- Golenberg EM (1991): Amplification and analysis of Miocene plant fossil. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 333: 419-427.

- Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley C, Durbin M, Henderson D, Zurawski C (1990): Chloroplast DNA sequences from a Miocene *Magnolia* species. *Nature* 344: 656-658.
- Goloubinoff P, Pääbo S, Wilson AC (1993): Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *adh2* gene segment from archaeological specimens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 1997-2001.
- Grobman A, Salhuana W, Sevilla R, Mangelsdorf P (1961): *Races of maize in Peru, their Origins, Evolution and Classification*. Publication 915, National Academy of Science, National Research Council, Washington, D.C. (EUA), 374p.
- Hagelberg E, Clegg JB (1991): Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceeding of the Royal Society of London*. 244: 45-50.
- Harlan JR (1971): Agricultural origins: centers and noncenters. *Science* 174: 468-474.
- Hawkes JG (1991): Centros de diversidad genética vegetal en Latinoamérica. *Diversity* 7: 7-9.
- Helentjaris T (1988): Does RFLP analysis of ancient Anazasi samples suggest that they utilized hybrid maize? *Maize Genetic Cooperation Newsletter* 62: 104-105.
- Henry RJ (2001): Exploiting cereal genetic resources. *Advances in Botanical Research* 34: 23-57.
- Hermann B, Hummel S (1994): *Ancient DNA. Recovery and Analysis of Genetic material from Paleontological, Archaeological*. Museum, Medical and Forensic Specimens. 1ª ed, Springer-Verlag, New York 263p.
- Hoisington D, Khairallah M, González de León D (1998): *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Mexico D. F. CIMMYT (3rd edition).
- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA (1988): DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85: 9436-9440.

- Jaccard P (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. *'Bulletin Society Vaud Science Natural'* 44: 223-270.
- Keatinge RW (1974): Urban settlement systems and rural sustaining communities: an example from Chan Chan's hinterland. *Journal of Field Archaeology* 2: 215-227.
- Manrique PM (1997): *El maíz en el Perú*. 2ª edición, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), 362p.
- Pääbo S (1985): Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.
- Pääbo S (1989): Ancient DNA extraction, characterization molecular cloning and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 1939-1943.
- Pääbo S, Higuchi RG, Wilson AC (1989): Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *Journal of Biological Chemistry* 265: 4718-4721.
- Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC (1990): DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *Journal of Biological Chemistry* 265: 4718-4721.
- Pearsall DM (1986): La Circulación Primitiva del Maíz entre Mesoamérica y Sudamérica. Pp. 231-258. Jorge Marcos (ed.) *Arqueología de la costa ecuatoriana: Nuevos Enfoques*. Guayaquil (Ecuador).
- Rohlf FJ (1997): NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.00. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, NY (EUA).
- Rollo F, Venanzi FM, Amici A (1994a): DNA and RNA from ancient plant seeds. Pp. 218-236. Hermann & Hummel (eds.) *Ancient DNA*. Springer-Verlag, New York, NY (EUA).
- Rollo F, Asci W, Sassaroli S (1994b): Assessing the genetic variation in pre-Columbian maize at that molecular level. Pp. 27-34. Adams RP, Miller JS, Golenberg EM and Adams J.E (eds.). *Conservation of Plant Genes II: Utilization of ancient and modern DNA*. Mo. Botanical Garden. St. Louis, MO (EUA).

- Rollo F, Venanzi FM, Amici A (1991): Nucleic acids in mummified plant seeds: biochemistry and molecular genetics of pre-Columbian maize. *Genetical Research* 58: 193-201.
- Sambrook J, Russell DW. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Senior ML, Heun M (1993): Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884-889.
- Sevilla R (1994): Variation in modern Andean maize and its implications for prehistoric patterns. Pp. 219-244. Johannessen, S. and Hastorf, C. A. (eds.). *Corn and Culture in the Prehistoric New World*. Westview Press, Boulder, CO (EUA).
- Smith S, Helentjaris T (1994): Integrating molecular and anthropological approaches to understand the co-evolution of maize and human cultures. Maize archaeobotanical investigations using DNA analytical methods. From an oral presentation. Held at the Holiday in Gateway Conference Center. Ames, Iowa, August 29-31. Sponsored Jointly by Pioneer Hi-Bred International, Iowa (EUA).
- Towle M (1961): *The Ethnobotany of Precolumbian Peru*. Viking Fund Publications in Anthropology 30, New York NY (EUA). 245p.
- Wang RL, Stec A, Hey J, Lukens L, Doebley JJ (1999): The limits of selection during maize domestication. *Nature* 398: 236-239.
- Yacovleff E, Herrera F (1934): El mundo vegetal de los antiguos peruanos. *Revista del Museo Nacional* 3: 241-322. Lima (Peru).



Identification by histology of wooden implements from two coastal prehistoric sites in the Casma Valley, Peru

¹Shelia Pozorski,² Teresa E. Rosales Tham, ³Thomas Pozorski, ⁴Víctor F. Vásquez Sánchez,

^{1, 3}Department of Psychology and Anthropology, University of Texas-Rio Grande Valley, USA, ²Laboratorio de Arqueobiología, Avda. Juan Pablo II s/n, Universidad Nacional de Trujillo, 13011 Trujillo (Perú); ⁴ Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas Arqueobios, C/. Martínez de Compañón 430-Bajo 100, Urbanización San Andrés, 13008 Trujillo (Perú)

Abstract

A sample of wooden implements that come from two pre-Hispanic sites in the Casma Valley (Bahía Seca and Huaynuná), among which fire starters stand out, were manufactured from wood, which histological analyses of the vascular anatomy indicated the use of *Prosopis* sp. wood “algarrobo”, using thick and thin secondary branches. These findings indicate that the generation of fire in pre-Hispanic times was carried out using technological knowledge and the use of wood, in this case using a species that has the characteristic of having resinous wood, favorable for the generation and obtaining of fire, a technology that would have extended over the period of 3,000 years in the prehistory of the Peruvian coast.

Keywords: Fire starters, wood, carob, Bahía Seca, Huaynuná

Resumen

Una muestra de implementos de madera que provienen de dos sitios prehispánicos del valle de Casma (Bahía Seca y Huaynuná), dentro de los que destacan iniciadores de fuego fueron fabricados a partir de madera, que los análisis histológicos de la anatomía vascular indicaron el uso de madera de *Prosopis* sp. “algarrobo”, utilizando ramas secundarias gruesas y delgadas. Estos hallazgos indican que la generación del fuego en tiempos prehispánicos se realizó utilizando conocimientos tecnológicos, y que del uso de las maderas, en este caso el de utilizar una especie que tiene como característica tener madera resinosa, favorable para la generación y obtención de fuego, fue una tecnología que se habría extendido a lo largo de 3.000 años en la prehistoria de la costa peruana.

Palabras clave: Iniciadores de fuego, madera, algarrobo, Bahía Seca, Huaynuná

Introduction

Archaeological sites on the Peruvian coast reveal various well-preserved archaeobotanical remains, especially wooden remains. Some wooden statues or idols have been studied from the perspective of the anatomy of their wood, to identify the tree from which it was made, as in the case of the Pachacamac idol, which is known to have been made from wood of "carob" *Prosopis* sp. (Sepúlveda et al, 2020). Another important idol, such as the one discovered in Huaca Cao Viejo, at the El Brujo archaeological complex, indicates that the species of tree from which its wood was used for its manufacture was *Pouteria lucuma* "lúcumo" (Franco and Gálvez, 2003).

As part of the 2018 season excavations of the Utzh An walled complex, of Chan Chan archaeological complex, 20 wooden sculpted statuettes were discovered, which were located within elaborate niches. Histological analyzes of the wood of the idols indicated the use of wood from *Prosopis pallida* "carob" and *Acacia* sp. "hawthorn" (Rosales et al, 2019).

In past decades, wooden implements, such as evidence of utensils, instruments, construction elements, objects that pre-Hispanic settlers used in their daily lives, did not present any interest and were described as "wooden artifacts", however a French specialist, Fanny Moutarde, began this type of studies on the north coast as part of her doctoral research, and her studies in wood and charcoal have made it possible to reconstruct the paleo-environment, the plant economy and the ritual world of these populations (Moutarde, 2007).

The objectives were to carry out the histological study of the wood and therefore identify the tree species that were used as raw material for the manufacture of these implements and also to know how the timber vegetation was used according to its features, for obtaining and efficiency of the implement manufactured in these sites and during their occupation in the Casma Valley.

Bahía Seca and Huaynuná

Excavations carried out by Thomas Pozorski and Shelia Pozorski during the 1980s in various sites in the Casma Valley have allowed valuable wooden implements to be recovered from Bahía Seca and Huaynuná.

The Bahía Seca site, with an area of two hectares, is located on the shore of a fossil bay about 5 km north of the Casma River. This site was excavated during June and July 1989. This site has two main occupations, one during the Late Preceramic Period (2.500-2.000 years BC) and the other during the Early Period (2.000-1.000 years BC) (Pozorski and Pozorski, 1992: 848, 859).

During the Late Pre-ceramic Period the site was a small fishing village. During the Initial Period, the site was used as a small administrative center for the political entity of Sechín Alto to control the distribution of marine resources (Pozorski and Pozorski, 1991: 352-353, 1996: 345-347, 1998: 93). The main evidence for this interpretation

is the presence of a medium-sized stone mound containing a square box, an architectural unit associated with activities at almost all of the Initial Period sites in the Casma Valley (Pozorski and Pozorski, 2011). Near the end of the Initial Period the site had another occupation by people who used Las Haldas-type ceramics, decorated with scoring areas.

After 2.000 years, the site was briefly reoccupied approximately 1.000 years AD. by people of the Casma culture. Three wooden implements that we studied and identified their wood belong to the late reoccupation of the Bahía Seca site.

The second site from which the remaining wooden implements come is Huaynuná, with a total area of 11.5 hectares, located on the shore of the Pacific Ocean about 13 km north of the Casma Valley. This site was excavated in 1986 and 1989. The main occupation was during the Late Preceramic Period with minor reoccupations during the Initial Period, the Early Horizon (1.000-200 years BC) and the Late Intermediate Period (1.000-1.470 years AD) (Pozorski and Pozorski, 1990:17).

Associated with the pre-ceramic occupation of the site is a stone building with an area of 20 m by 20 m, built on a slope to a maximum elevation of 8 meters (Pozorski and Pozorski, 1990: 24; 1992: 849-850). This building has four terraces divided in the middle by a stone staircase. It is possible that this building was used for religious ceremonies or other public activities. When the building was abandoned near the end of the Late Preceramic Period, the site's occupants covered the building with garbage containing mollusks and especially barnacles (parrot beak). Two of the five wooden implements studied are from Huaynuná and come from this not very deep garbage deposition.

The other three artifacts examined belong to the Early Horizon occupation, which consists mainly of a midden that partially covers a stone building measuring about 12 m by 4 m. The three artifacts were found about 20-40 cm below the modern surface within this midden.

Materials and methods

Samples

Wooden implements from the Bahía Seca site There are three wooden implements for this site, and they have the following name:

C22A1-2=126 (fire-making implement, Fig. 1), C22A1-2=491 (excavating implement, figure 2) and C22A1-2=591 (worked wood, figure 3). These three wooden implements come from the depositions of superficial sediments (20-90 cm below the modern surface), affected by rainwater, that covered the mound containing the fourth square. The other artifacts and ceramics associated with the surface deposition indicate that these sediments belong to the Late Intermediate Period and the Casma culture about 1.000 years AD.



Figure 1. Fire-making implement, code C22A1-2=126 (Photo: Thomas and Shelia Pozorski)



Figure 2. Implements for digging, code C22A1-2=491 (Photo: Thomas and Shelia Pozorski)



Figure 3. Worked wood implement, code C22A1-2=591 (Photo: Thomas and Shelia Pozorski)

Wooden implements from the Huaynuná site

From the Huaynuná site, there are five wooden implements, and they have the following denomination: C3B1-7=980 (digging stick, Fig. 4) and C3B1-7=1146 (digging stick, Fig. 5). These two wooden implements come from the surface deposition on top of the building with four terraces. The other artifacts associated with this deposition and the absence of ceramics indicate that these wooden artifacts belong to the Late Preceramic Period.



Figure 4. Wooden digging implement, code C3B1-7=980 (Photo: Thomas and Shelia Pozorski)



Figure 5. Wooden digging implement, code C3B1-7=1146 (Photo: Thomas and Shelia Pozorski)

The remaining three elements are: C3B1-29=33 (fire-making implement, Fig. 6), C3B1-29=39 (fire-making implement, Fig. 7) and C3B1-29=156 (fire-making implement, figure 8). These three wooden implements come from the garbage that partially covers a stone building. The artifacts were discovered about 20-40 cm below the modern surface. The other artifacts and pottery associated with this trash belong to the Early Horizon and, by association, the wooden implements as well.



Figure 6. Fire-making implement, code C3B1-29=33 (Photo: Thomas and Shelia Pozorski)



Figure 7. Implements for making fire, code C3B1-29=39 (Photo: Thomas and Shelia Pozorski)



Figure 8. Fire-making implement, code C3B1-29=156 (Photo: Thomas and Shelia Pozorski)

Treatment and taxonomic identification

The wood samples of the studied implements were obtained from the parts that had old breaks. The wood samples were sectioned transversely and longitudinally to aid in the taxonomic identification of the wood from the cellular tissues. The vascular anatomy of wood is based on the observation and characterization of different cell types (fibers, parenchyma, vessels, etc.) in the secondary xylem of the wood. These

may include size, quantity, arrangement, opening types, and cell wall properties, among other elements. The observations were made in two planes or anatomical sections: transverse and longitudinal-tangential, to allow each element to be examined in its entirety, since some characteristics can only be seen in specific planes (Esau, 1995). Taxa can be differentiated based on the specific combination of several criteria or traits displayed by specific elements of the cellular tissue. This allow the identification down to the species level, for taxa that feature peculiar and distinctive elements.

For a make most precise identification, we had access to modern and ancient comparative samples of tree species native to the northern and central coast. Wood samples are usually prepared by obtaining a thin section of the used wood fragment for visualization under a reflected light stereomicroscope.

Once the best section that showed the desired characteristics for identification was obtained, a microphotographic record was made with a CANON EOS Rebel T3i 18 Megapixel camera, and then the images were analyzed on a computer screen, with images of the vascular anatomy. from the comparative woods of native trees and the database <https://insidewood.lib.ncsu.edu>

Results and discussion

The wood samples from the Huaynuná and Bahía Seca implements are composed of heteroxylar log wood, with diffuse porosity, hard and resinous, such as the wood of *Prosopis sp.* “carob tree” identified in seven implements, and one wooden implement, also of diffuse porosity, without the presence of resin, with muciparous substances, easy to carve, which due to its anatomical-vascular characteristics corresponded to *Pouteria lucuma* “lúcumo” (Table 1).

Table 1. Wooden implements, taxonomic identification and origin according to sites

Sitios	Código	Descripción	Identificación taxonómica	Nombre común
Bahía Seca	C22A1-2=126	Implemento para hacer fuego	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C22A1-2=491	Implemento para excavar	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C22A1-2=591	Madera trabajada	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
Huaynuná	C3B1-7=980	Implemento para excavar	<i>Pouteria lucuma</i>	"lúcumo"
	C3B1-7=1146	Implemento para excavar	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C3B1-29=33	Implemento para hacer fuego	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C3B1-29=39	Implemento para hacer fuego	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C3B1-29=156	Implemento para hacer fuego	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"

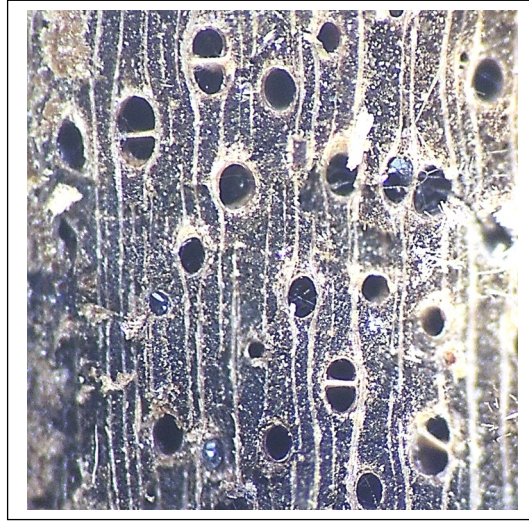


Figure 9. Cross section of the wooden implements identified as *Prosopis* sp. "carob tree"

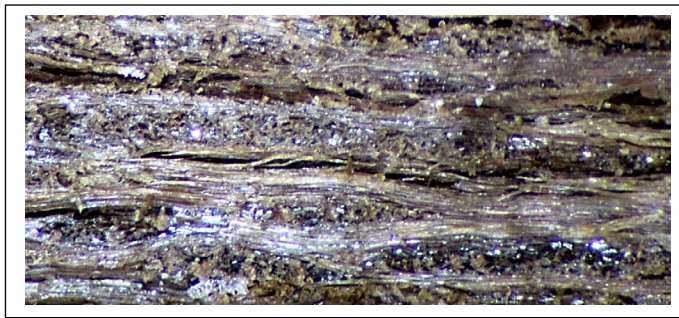


Figure 10. Longitudinal section of the wooden implements identified as *Prosopis* sp. "carob tree"



Figure 11. Cross section of the wooden implement identified as *Pouteria lucuma* "lúcumo"

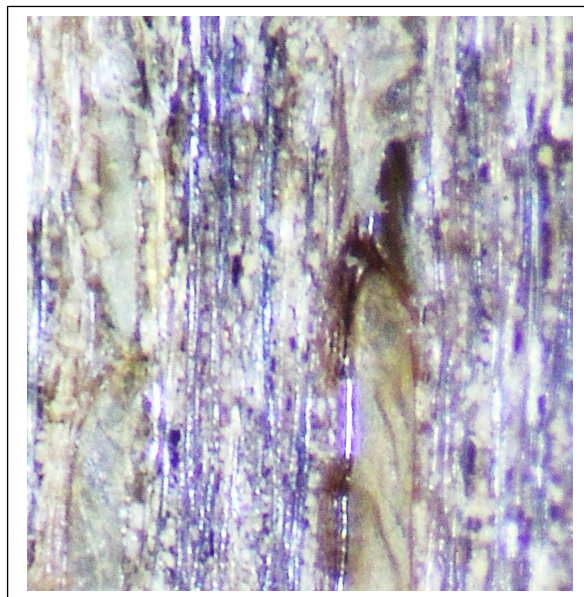


Figure 12. Longitudinal section of the wooden implement identified as *Pouteria lucuma* “lúcumo”

Regarding the histological characteristics of the identified wooden implements, the wood of *Prosopis sp.* “carob” in cross section (Fig. 9), has 21 visible vessels, no tyloses and the axial parenchyma is vasicentric and presents traits of wood from juvenile trees. They feature simple perforation plates and the fossae between the vessels are alternate, from oval to angular, they present frequent geniculate vessels, and in longitudinal section, they show very evident irregular deviations (Fig. 10).

According to the described characteristics of the vascular anatomy of these woods, they are from the Leguminosae family (Fabaceae), and with a high probability of *Prosopis sp.* and possibly *Prosopis pallida*, which is the endemic species that grows in the forests of the northern and central coast of Peru.

The digging implement that comes from Huaynuná was manufactured from *Pouteria lucuma* “lúcumo”, a wood of diffuse porosity, with large vessels of uniform distribution, surrounded by developed fibers, with medullary rays, diffuse axial parenchyma in aggregates (Fig. 11), with simple perforated plates, shape of alternating polygonal wells (Fig. 12). These features correspond to the Sapotaceae family and being the “lúcumo” a fruit tree with wood that is easy to carve, the identification has no doubts.

Fire Starters

In this study, four implements stand out for making fire using the friction method. One of them is a “stick” made from a secondary “carob” branch, which is polished

and has traces of use at the ends (Fig. 1), and comes from the Bahía Seca site, associated with artifacts and ceramics from the Casma culture, about 1.000 years AD.

The other three implements for making fire come from Huaynuná, The first one (Fig. 6) is a portion of a secondary, thicker branch, which has five holes where the stick described above would fit (Fig. 1), where due to friction by the oscillating movements made with the hands cause the fire to start. This implement did not show signs of burns but did show signs of use. The second sample is made up of three implements, one (top of Fig. 7) is a fire starter in the process of being manufactured, because the bark of the secondary branch has not yet been removed and only a hole has been manufactured to make the friction. The other implements of this sample are two sticks similar to the Bahía Seca sample, also made from secondary branches, with the ends used (middle and bottom of Fig. 7).

The third implement is a starter that has four holes made in a wider wooden base, This one shows traces of fire inside the holes and it is partially incomplete (Fig. 8). These wooden implements come from an accumulation of trash with other artifacts and pottery of the Early Horizon (1.400 years BC to 100 years BC).

In the Andean world there are two documented ways of making fire, One is from the highlands, where three plants were used: branches of *Polylepis* “queñoa”, woody bushes of *Parastrephia* spp. “tola” and *Azorella compacta* “yareta”, a resinous plant, this plant being the main fuel in the Andes and has been identified through ge archaeological studies (Meinekat et al, 2023).

The resin is a complex mixture of chemical compounds that include terpenes, flavonoids, alkaloids, phenolic compounds, among others, which are highly flammable, For this reason the “carob” tree is the ideal wood for making fire starters, because the resin contained in wood is an ideal ally for the origin of fire.

On the pre-Hispanic coast, there must be various remains of fire starters made of wood, but unfortunately, they have not been studied and reported, except for the case of a fire starter evidenced in the excavations in Uripe, which was analyzed by Dr. Abundio Sagastegui (Botanical) and identified as carob. According to Rosales and Figueroa (1982), the starter and its rubbing stick were found on top of a Chimú pot, in a domestic kitchen context. This implies that the use of these artifacts to make fire would have a long history on the Peruvian coast, approximately 3.000 years.

The other wooden implements would have had a digging function; however, they may have had other various uses. The recurrent identification of the use of the wood of the “carob” *Prosopis* sp. possibly *Prosopis pallida*, which has also been identified at the coal level, which confirms its usefulness as fuel. These trees were surely covering the adjacent landscape of Bahía Seca and Huaynuná, and their record is very extensive throughout the prehistory of the Peruvian coast.

References

- Esau K (1995): *Anatomía Vegetal*. Ed. Omega. Barcelona. España
- Franco R, Gálvez C (2003): Un ídolo de madera en un edificio mochica temprano de la Huaca Cao Viejo, Complejo El Brujo. *Arkinka* 93, Año 8: 94-105.
- Moutarde F (2007): La madera y los carbones como testigos del paleo-ambiente, la economía vegetal y el mundo ritual del Perú Precolombino. Metodología y problemáticas. *Arqueología y Sociedad* 18: 11-36.
- Meinekat S, Rademaker K, Milton E, Furlotte B, Zarrillo S (2023): Fire as high-elevation cold adaptation: An evaluation of fuels and Terminal Pleistocene combustion in the Central Andes. *Quaternary Science Reviews* 316 (2): 108244.
- Pozorski S, Pozorski T (1991): Storage, Access Control, and Bureaucratic Proliferation: Understanding the Initial Period (1800-900 B.C.) Economy at Pampa de las Llamas-Moxeke, Casma Valley, Peru. *Research in Economic Anthropology* 13: 341-371.
- Pozorski S, Pozorski T (1992): Early Civilization in the Casma Valley, Peru. *Antiquity* 66: 845-870.
- Pozorski S, Pozorski T (2011): The Square-room Unit as an Emblem of Power and Authority within the Initial Period Sechín Alto Polity, Casma Valley, Peru. *Latin American Antiquity* 22: 1-25.
- Pozorski T, Pozorski S (1990): Huaynuná, a Late Cotton Preceramic Site on the North Coast of Peru. *Journal of Field Archaeology* 17: 17-26.
- Rosales T, Figueroa F (1982): Dieta y Alimentación del poblador antiguo de la Quebrada de Uripe, Salaverry-Trujillo. Trabajo de Investigación para obtener el Grado de Bachiller en Ciencias Sociales. Universidad Nacional de Trujillo.
- Rosales T, Gamarra N, Gayoso H (2019): Análisis arqueométricos de las estatuillas de madera del conjunto amurallado Utzh An (expalacio Gran Chimú) del complejo arqueológico Chan Chan, costa norte del Perú. *Archaeobios* 13: 5-22.
- Sepúlveda M, Pozzi-Escot D, Angeles R, Bermeo N, Lebon M, Moulhérat C, Sarrazin P, Walter P (2020): Unraveling the polychromy and antiquity of the Pachacamac Idol, Pacific coast, Peru. *PLoS ONE* 15(1): e0226244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226244>

Identificación mediante histología de implementos de madera de dos sitios prehistóricos costeros en el valle de Casma, Perú

¹Shelia Pozorski,² Teresa E. Rosales Tham, ³Thomas Pozorski, ⁴Víctor F. Vásquez Sánchez,

^{1, 3}Department of Psychology and Anthropology, University of Texas-Rio Grande Valley, USA, ²Laboratorio de Arqueobiología, Avda. Juan Pablo II s/n, Universidad Nacional de Trujillo, 13011 Trujillo (Perú); ⁴Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas Arqueobios, C/. Martínez de Compañón 430-Bajo 100, Urbanización San Andrés, 13008 Trujillo (Perú)

Resumen

Una muestra de implementos de madera que provienen de dos sitios prehispánicos del valle de Casma (Bahía Seca y Huaynuná), dentro de los que destacan iniciadores de fuego fueron fabricados a partir de madera, que los análisis histológicos de la anatomía vascular indicaron el uso de madera de *Prosopis sp.* “algarrobo”, utilizando ramas secundarias gruesas y delgadas. Estos hallazgos indican que la generación del fuego en tiempos prehispánicos se realizó utilizando conocimientos tecnológicos y del uso de las maderas, en este caso de utilizar una especie que tiene como característica tener madera resinosa, favorable para la generación y obtención de fuego, una tecnología que se habría extendido por el lapso de 3.000 años en la prehistoria de la costa peruana.

Palabras clave: Iniciadores de fuego, madera, algarrobo, Bahía Seca, Huaynuná

Abstract

A sample of wooden implements that come from two pre-Hispanic sites in the Casma Valley (Bahía Seca and Huaynuná), among which fire starters stand out, were manufactured from wood, which histological analyses of the vascular anatomy indicated the use of *Prosopis sp.* wood “algarrobo”, using thick and thin secondary branches. These findings indicate that the generation of fire in pre-Hispanic times was carried out using technological knowledge and the use of wood, in this case using a species that has the characteristic of having resinous wood, favorable for the generation and obtaining of fire, a technology that would have extended over the period of 3,000 years in the prehistory of the Peruvian coast.

Keywords: Fire starters, wood, carob, Bahía Seca, Huaynuná

Introducción

Los sitios arqueológicos en la costa peruana revelan diversos restos arqueobotánicos en buena conservación, en especial restos de madera. Algunas estatuas o ídolos de madera han sido estudiados desde la perspectiva de la anatomía de su madera, para identificar el árbol a partir del cual fue fabricado, como es el caso del ídolo de Pachacamac, del cual se conoce que fue elaborado a partir de madera de “algarrobo” *Prosopis sp.* (Sepúlveda et al, 2020). Otro ídolo importante como el descubierto en Huaca Cao Viejo, en el complejo arqueológico El Brujo, se indica que la especie de árbol a partir del cual fue utilizada su madera para su fabricación fue *Pouteria lucuma* “lúcumo” (Franco y Gálvez, 2003).

En el marco de las excavaciones de la temporada 2018 del conjunto amurallado Uzh An, en el complejo arqueológico Chan Chan, se descubrieron 20 estatuillas esculpidas en madera, que estaban ubicadas dentro de nicho elaborados. Los análisis histológicos de la madera de los ídolos indicaban el uso de madera de *Prosopis pallida* “algarrobo” y *Acacia sp.* “espino” (Rosales et al, 2019).

En décadas pasadas, los implementos de madera, como evidencias de utensilios, instrumentos, elementos de construcción, objetos que los pobladores prehispánicos utilizaban en su vida diaria, no presentaban ningún interés y eran descritos como “artefactos de madera”, sin embargo una especialista francesa, Fanny Moutarde, inicia este tipo de estudios en la costa norte como parte de sus investigaciones doctorales, y sus estudios en madera y carbones, han permitido reconstruir el paleo-ambiente, la economía vegetal y el mundo ritual de estas poblaciones (Moutarde, 2007).

Los objetivos fueron realizar el estudio histológico de la madera y por lo tanto identificar la especie arbórea que fue utilizada como materia prima para la fabricación de estos implementos y conocer cómo fue el uso de la vegetación maderable según sus características, para la obtención y eficiencia del implemento fabricado en estos sitios y durante su ocupación en el valle de Casma.

Bahía Seca y Huaynuná

Excavaciones que realizaron Thomas Pozorski y Shelia Pozorski, durante la década del 1980, en varios sitios del valle de Casma, han permitido rescatar valiosos implementos de madera, de Bahía Seca y Huaynuná.

El sitio de Bahía Seca, con un área de dos hectáreas, está ubicado a la orilla de una

bahía fósil unos 5 km al norte del río Casma. Este sitio fue excavado durante junio y julio de 1989. Hay dos ocupaciones principales del sitio, una durante el Período Precerámico Tardío (2.500-2.000 años a.C.) y la otra durante el Período Inicial (2.000-1.000 años a.C.) (Pozorski y Pozorski, 1992: 848, 859).

Durante el precerámico tardío el sitio fue una aldea pequeña de pescadores. Durante el período inicial, el sitio fue usado como un centro pequeño administrativo de la entidad política de Sechín Alto para controlar la distribución de recursos marinos (Pozorski y Pozorski, 1991: 352-353, 1996: 345-347, 1998: 93). La evidencia principal para esta interpretación es la presencia de un montículo de piedra de tamaño mediano que contiene un cuadro cuadrado, una unidad arquitectónica asociada con actividades en casi todos de los sitios del Período Inicial en el valle de Casma (Pozorski y Pozorski, 2011). Cerca el fin del período inicial el sitio tuvo otra ocupación por gente que usaba cerámica de tipo Las Haldas, decorada con zonas de puntuaciones.

Después de 2.000 años, el sitio fue reocupado brevemente aproximadamente 1.000 años d.C. por gente de la cultura Casma. Tres implementos de madera que estudiamos e identificamos su madera, pertenecen a la reocupación tardía del sitio Bahía Seca.

El segundo sitio de donde provienen los restantes implementos de madera es Huaynuná, con un área total de 11.5 Ha, ubicado a la orilla del océano Pacífico unos 13 km al norte del valle de Casma. Este sitio fue excavado en 1986 y 1989. La ocupación principal fue durante el período precerámico tardío con reocupaciones menores durante el período inicial, el horizonte temprano (1.000-200 años a.C.) y el período intermedio tardío (1.000-1.470 años d.C.) (Pozorski y Pozorski, 1990:17).

Asociado con la ocupación precerámica del sitio hay un edificio de piedra con un área de 20 m por 20 m, construido sobre una ladera hasta una elevación máxima de 8 m (Pozorski y Pozorski, 1990: 24; 1992: 849-850). Este edificio tiene cuatro terrazas divididas en medio por una escalera de piedra. Es posible que este edificio fue usado por ceremonias religiosas u otras actividades públicas. Cuando el edificio fue abandonado cerca el fin del Período Precerámico Tardío, los ocupantes del sitio cubrieron el edificio con basura que contenía moluscos y especialmente barnaclas (pico loro). Dos de los cinco implementos de madera estudiados, son de Huaynuná y vienen de esta deposición de basura no muy profundo. Los otros tres artefactos examinados pertenecen a la ocupación del horizonte temprano. Esta ocupación consiste principalmente de un basural que cubre parcialmente un edificio de piedra que mide unos 12 m por 4 m. Los tres artefactos fueron encontrados unos 20-40 cm debajo la superficie moderna dentro de este basural.

Materiales y Métodos

Muestras

Implementos de madera del sitio de Bahía Seca

Son tres los implementos de madera para este sitio y tienen la siguiente denominación: C22A1-2=126 (implemento para hacer fuego, Fig. 1), C22A1-2=491 (implemento para excavar, figura 2) y C22A1-2=591 (madera trabajada, figura 3). Estos tres implementos de madera vienen de las deposiciones de sedimentos superficiales (20-90 cm debajo de la superficie moderna), afectados por agua de lluvia, que cubren el montículo que contiene el cuarto cuadrado. Los otros artefactos y cerámicas asociadas con la deposición superficial indican que estos sedimentos pertenecen al período intermedio tardío y la cultura Casma cerca de 1.000 años d.C.



Figura 1. Implemento para hacer fuego, código C22A1-2=126 (Foto: Thomas y Shelia Pozorski)



Figura 2. Implementos para excavar, código C22A1-2=491 (Foto: Thomas y Shelia Pozorski)



Figura 3. Implemento de madera trabajada, código C22A1-2=591 (Foto: Thomas y Shelia Pozorski)

Implementos de madera del sitio de Huaynuná

Del sitio Huaynuná, son cinco implementos de madera y tienen la siguiente denominación: C3B1-7=980 (palo para excavar, Fig. 4) y C3B1-7=1146 (palo para excavar, Fig. 5). Estos dos implementos de madera vienen de la deposición superficial encima del edificio con cuatro terrazas. Los otros artefactos asociados con esta deposición y la ausencia de cerámica indica que estos artefactos de madera pertenecen al período precerámico tardío.



Figura 4. Implemento de madera para excavar, código C3B1-7=980 (Foto: Thomas y Shelia Pozorski)



Figura 5. Implemento de madera para excavar, código C3B1-7=1146 (Foto: Thomas y Shelia Pozorski)

Los restantes tres elementos son: C3B1-29=33 (implemento para hacer fuego, Fig. 6), C3B1-29=39 (implemento para hacer fuego, Fig. 7) y C3B1-29=156 (implemento para hacer fuego, figura 8). Estos tres implementos de madera vienen de la basura que cubre parcialmente un edificio de piedra. Se descubrieron los artefactos unos 20-40 cm debajo de la superficie. Los otros artefactos y cerámica asociados con esta basura pertenecen al Horizonte Temprano y, por asociación, los implementos de madera también.



Figura 6. Implemento para hacer fuego, código C3B1-29=33 (Foto: Thomas y Shelia Pozorski)



Figura 7. Implementos para hacer fuego, código C3B1-29=39 (Foto: Thomas y Shelia Pozorski)



Figura 8. Implemento para hacer fuego, código C3B1-29=156 (Foto: Thomas y Shelia Pozorski)

Tratamiento e identificación taxonómica

Las muestras de madera de los implementos estudiados se obtuvieron de las partes que presentaban roturas antiguas. Las muestras de madera fueron seccionadas transversal y longitudinalmente para ayudar en su identificación taxonómica de la madera a partir de los tejidos celulares. La anatomía vascular de las maderas se basa en la observación y caracterización de diferentes tipos celulares (fibras, parénquima, vasos, etc.) en la xilema secundaria de la madera. Estos pueden incluir

tamaño, cantidad, disposición, tipos de apertura y propiedades de la pared celular, entre otros elementos. Las observaciones se realizaron en dos planos o secciones anatómicas: transversal y longitudinal-tangencial, para permitir examinar cada elemento en su totalidad, ya que algunas características sólo pueden apreciarse en planos específicos (Esau, 1995). Los taxones pueden diferenciarse basados en la combinación específica de varios criterios o características mostradas por elementos específicos del tejido celular. Esto puede permitir la identificación hasta el nivel de especie, para taxones que presentan elementos peculiares y distintivos.

Para realizar la identificación más precisa, tuvimos acceso a muestras comparativas modernas y antiguas, de las especies de árboles nativos de la costa norte y central. Las muestras de madera generalmente se preparan obteniendo una sección delgada del fragmento de madera utilizado para su visualización bajo un microscopio estereoscopio de luz reflejada.

Una vez obtenida la mejor sección que mostraba las características deseadas para su identificación, se hizo un registro microfotográfico con una cámara CANON EOS Rebel T3i de 18 megapíxel, para luego las imágenes ser analizadas en una pantalla de computadora, con las imágenes de la anatomía vascular de las maderas comparativas de árboles nativos y la base de datos <https://insidewood.lib.ncsu.edu>

Resultados y Discusión

Las muestras de madera de los implementos de Huaynuná y Bahía Seca está compuesta por madera de leño heteroxilar, de porosidad difusa, dura y resinosa, como es la madera de *Prosopis sp.* "algarrobo" identificada en siete implementos, y un implemento de madera, también de porosidad difusa, sin presencia de resina, con sustancias mucíparas, fácil de tallar, que por sus características anatómico-vasculares correspondía a *Pouteria lucuma* "lúcumo" (Tabla 1).

Tabla 1. Implementos de madera, identificación taxonómica y procedencia según sitios

Sitios	Código	Descripción	Identificación taxonómica	Nombre común
Bahía Seca	C22A1-2=126	Implemento para hacer fuego	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C22A1-2=491	Implemento para excavar	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C22A1-2=591	Madera trabajada	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
Huaynuná	C3B1-7=980	Implemento para excavar	<i>Pouteria lucuma</i>	"lúcumo"
	C3B1-7=1146	Implemento para excavar	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C3B1-29=33	Implemento para hacer fuego	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C3B1-29=39	Implemento para hacer fuego	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"
	C3B1-29=156	Implemento para hacer fuego	<i>Prosopis sp.</i>	"algarrobo"

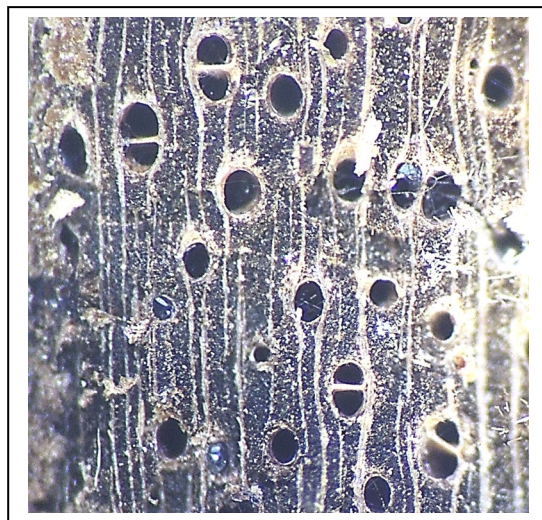


Figura 9. Sección transversal de los implementos de madera identificados como *Prosopis sp.* “algarrobo”

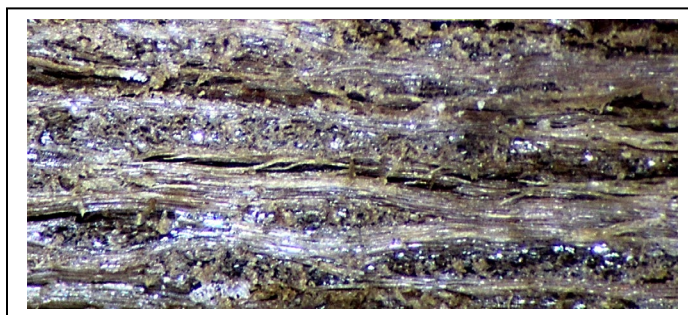


Figura 10. Sección longitudinal de los implementos de madera identificados como *Prosopis sp.* “algarrobo”



Figura 11. Sección transversal del implemento de madera identificado como *Pouteria lucuma* “lúcumo”

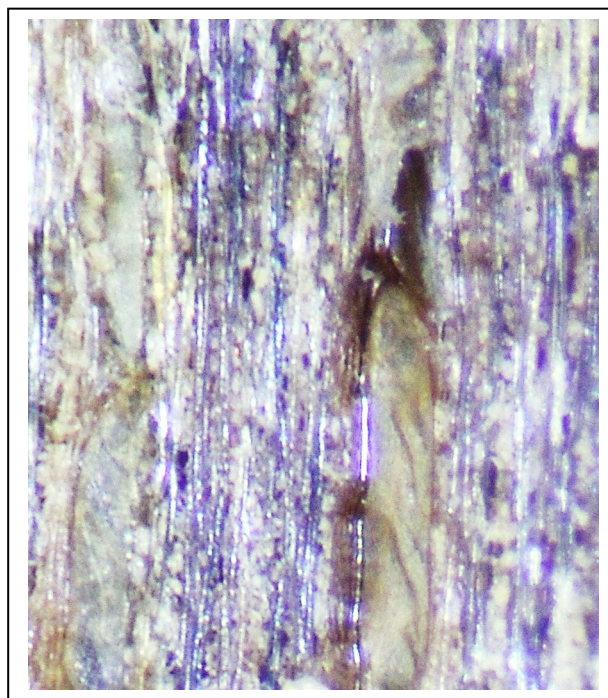


Figura 12. Sección longitudinal del implemento de madera identificado como *Pouteria lucuma* “lúcumo”

En lo que se refiere a las características histológicas de los implementos de madera identificados, la madera de *Prosopis sp.* “algarrobo” en sección transversal (Fig. 9), presenta 21 vasos visibles, no presentan tilides y el parénquima axial es vasicéntrico y presenta características de madera de árboles juveniles. Presentan placas de perforación simple y las fosas entre los vasos son alternas, de ovaladas a angulares, presentan frecuentes vasos geniculados, y en corte longitudinal, muestran desvíos irregulares muy evidentes (Fig. 10).

Según las características descritas de la anatomía vascular de estas maderas, son de la familia Leguminosae (Fabaceae), y con alta probabilidad de *Prosopis sp.* y posiblemente de *Prosopis pallida*, que es la especie endémica que crece en los bosques de la costa norte y centro del Perú.

El implemento para excavar que proviene de Huaynuná, fue fabricado a partir de madera de *Pouteria lucuma* “lúcumo”, una madera de porosidad difusa, con grandes vasos de distribución uniforme, rodeados de fibras desarrolladas, con radios medulares, parénquima axial difuso en agregados (Fig. 11), con placas perforadas simples, forma de pozos alternos poligonal (Fig. 12). Estas características

corresponden a la familia Sapotaceae, y siendo el “lúcumo” un árbol frutal con una madera fácil de tallar, la identificación no tiene dudas.

Iniciadores de Fuego

Resaltan en este estudio cuatro implementos para hacer fuego por el método de fricción, uno de ellos un “palo” trabajado a partir de una rama secundaria de “algarrobo”, se encuentra pulida y con los extremos con huellas de uso (Fig. 1), y proviene del sitio Bahía Seca, asociado a artefactos y cerámica de la cultura Casma, cerca de 1.000 años d.C.

Los otros tres implementos para hacer fuego provienen de Huaynuná, el primero (Fig. 6) es una porción de una rama secundaria, más gruesa, que tiene cinco orificios donde encajarían el palo descrito anteriormente (Fig. 1), donde por la fricción por los movimientos oscilantes realizados con las manos, se consigue originar el fuego. Este implemento no presentaba huellas de quemaduras, pero presentaba huellas de uso. La segunda muestra lo constituyen tres implementos, uno (superior de la Fig. 7) es un iniciador de fuego en vías de fabricación, porque aún no se le ha quitado la corteza de la rama secundaria y solo se fabricado un orificio para realizar la fricción. Los otros implementos de esta muestra son dos palos parecidos a la muestra de Bahía Seca, también fabricados de ramas secundarias, con los extremos usados (medio e inferior de la Fig. 7).

El tercer implemento es un iniciador que presenta cuatro orificios fabricados en una base de madera más ancha, este si presenta huellas de fuego en el interior de los orificios, y esta parcialmente incompleto (Fig. 8). Estos implementos de madera vienen de una acumulación de basura con otros artefactos y cerámica asociada al Horizonte Temprano (1.400 años a.C. hasta 100 años a.C.)

En el mundo andino hay documentadas dos formas de hacer fuego, una en los andes, donde se utilizaba tres plantas: ramas de *Polylepis* “queñoa”, arbustos leñosos de *Parastrephia* spp. “tola” y *Azorella compacta* “yareta” una planta resinosa, siendo esta planta el principal combustible en los andes y que fue identificada mediante estudios geoarqueológicos (Meinekat et al, 2023).

La resina es una mezcla compleja de compuestos químicos dentro de los que se incluyen terpenos, flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos, entre otros, los cuales son altamente inflamables, por esta razón el “algarrobo” resulta la madera ideal para fabricar iniciadores de fuego, porque la resina que contiene la madera es un aliado ideal para el origen del fuego.

En la costa prehispánica, deben existir diversos hallazgos de iniciadores de fuego fabricados con madera, pero lamentablemente no han sido estudiados y reportados, salvo el caso de un iniciador de fuego evidenciado en las excavaciones en Uripe, el cual fue analizado por el Dr. Abundio Sagastegui (Botánico) e identificado como algarrobo. Según Rosales y Figueroa (1982), el iniciador y su palo para frotar, fueron encontrados encima de una olla Chimú, en un contexto de cocina doméstica. Esto implica que el uso de estos artefactos para realizar fuego, tendrían una larga historia en la costa peruana, aproximadamente 3.000 años.

Los otros implementos de madera son asignados con una función para excavar, sin embargo, es posible que hayan tenido diversos usos. La identificación recurrente del uso de la madera del “algarrobo” *Prosopis sp.* posiblemente *Prosopis pallida*, que también ha sido identificada a nivel de carbones, lo cual confirma su utilidad como combustible. Estos árboles seguramente estuvieron cubriendo el paisaje adyacente de Bahía Seca y Huaynuná, y su registro es muy amplio a lo largo de la prehistoria de la costa peruana.

Referencias Bibliográficas

Esau K (1995): *Anatomía Vegetal*. Ed. Omega. Barcelona. España

Franco R, Gálvez C (2003): Un ídolo de madera en un edificio mochica temprano de la Huaca Cao Viejo, Complejo El Brujo. *Arkinka* 93, Año 8: 94-105.

Moutarde F (2007): La madera y los carbones como testigos del paleo-ambiente, la economía vegetal y el mundo ritual del Perú Precolombino. Metodología y problemáticas. *Arqueología y Sociedad* 18: 11-36.

Meinekat S, Rademaker K, Milton E, Furlotte B, Zarrillo S (2023): Fire as high-elevation cold adaptation: An evaluation of fuels and Terminal Pleistocene combustion in the Central Andes. *Quaternary Science Reviews* 316 (2): 108244.

Pozorski S, Pozorski T (1991): Storage, Access Control, and Bureaucratic Proliferation: Understanding the Initial Period (1800-900 B.C.) Economy at Pampa de las Llamas-Moxeke, Casma Valley, Peru. *Research in Economic Anthropology* 13: 341-371.

Pozorski S, Pozorski T (1992): Early Civilization in the Casma Valley, Peru. *Antiquity* 66: 845-870.

Pozorski S, Pozorski T (2011): The Square-room Unit as an Emblem of Power and Authority within the Initial Period Sechín Alto Polity, Casma Valley, Peru. *Latin*

American Antiquity 22: 1-25.

Pozorski T, Pozorski S (1990): Huaynuná, a Late Cotton Preceramic Site on the North Coast of Peru. *Journal of Field Archaeology* 17: 17-26.

Rosales T, Figueroa F (1982): Dieta y Alimentación del poblador antiguo de la Quebrada de Uripe, Salaverry-Trujillo. Trabajo de Investigación para obtener el Grado de Bachiller en Ciencias Sociales. Universidad Nacional de Trujillo.

Rosales T, Gamarra N, Gayoso H (2019): Análisis arqueométricos de las estatuillas de madera del conjunto amurallado Utzh An (expalacio Gran Chimú) del complejo arqueológico Chan Chan, costa norte del Perú. *Archaeobios* 13: 5-22.

Sepúlveda M, Pozzi-Escot D, Angeles R, Bermeo N, Lebon M, Moulhérat C, Sarrazin P, Walter P (2020): Unraveling the polychromy and antiquity of the Pachacamac Idol, Pacific coast, Peru. *PLoS ONE* 15(1): e0226244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226244>

Evidencias de almidones de plantas cultivadas en sedimentos de cerámica doméstica de La Fortaleza, Kuélap-Departamento de Amazonas Rosa M. Mayanga Cornejo¹ y Teresa E. Rosales²

¹Autor para correspondencia, Licenciada en Arqueología, Universidad Nacional de Trujillo, eMail: rosa.mayanga.cornejo@gmail.com; ²Laboratorio de Arqueobiología, Escuela Profesional de Arqueología, Universidad Nacional de Trujillo-Perú, eMail: trosales@unitru.edu.pe

Resumen

Se ha tomado una muestra de fragmentos de cerámica con evidencias microbotánicas adheridas dentro de los sedimentos al interior de la cerámica. Éstas proceden del sitio La Fortaleza, Kuélap, Departamento de Amazonas en Perú. Dichas muestras fueron recuperadas en las excavaciones arqueológicas del Programa de Investigaciones Arqueológicas Kuélap, temporada 2010.

El objetivo ha sido determinar el consumo de alimentos vegetales mediante el estudio microbotánico identificando la identidad de los granos de almidón.

Los resultados, dan a conocer la presencia de granos de almidón de *Zea mays* “maíz” y *Manihot esculenta* “yuca” de los cuales se llevó el registro de sus características y medidas, así como su registro microfotográfico. Paralelamente se revisó la cerámica para compararla con muestras cerámicas de temporadas pasadas. Esto llevó a proponer que estos vegetales eran almacenados en urpos, cántaros, ollas, platos y/o keros, lo que demuestra su importancia para la alimentación de los pobladores de la sociedad Chachapoyas que probablemente lo consumían en sus rituales y/o ceremonias realizadas en La Fortaleza, Kuélap.

Palabras clave: Antiguo Perú, estudios microbotánicos, arqueobotánica.

Abstract

A sample of ceramic fragments has been taken with microbotanical evidence attached within the sediments inside the ceramic. These come from the La Fortaleza site, Kuélap, Department of Amazonas in Peru. These samples were recovered in the archaeological excavations of the Kuélap Archaeological Research Program, 2010 season.

The objective has been to determine the consumption of plant foods through microbotanical study identifying the identity of starch grains.

The results reveal the presence of starch grains from *Zea mays* “corn” and *Manihot esculenta* “cassava” of which a record of their characteristics and measurements was kept, as well as their photomicrograph record. At the same time, the ceramics were reviewed to compare them with ceramic samples from past seasons. This led to the proposal that these vegetables were stored in urpos, jugs, pots, plates and/or keros, which demonstrates their importance for the nutrition of the inhabitants of the Chachapoyas society who probably consumed them in their rituals and/or ceremonies carried out in The Fortress, Kuélap

Keywords: Ancient Peru, microbotanical studies, archaeobotany.

Introducción

Kuélap es un importante yacimiento prehispánico de la cultura Chachapoyas (1.000 años d.C. a 1.450 años d.C.) ubicado en los andes nororientales del Perú, en la provincia de Luya, distrito de Tingo, departamento de Amazonas (Figura 1).

Las características de su entorno nos muestran un relieve muy accidentado y abrupto, que tiende a descender hacia el oriente, donde gradualmente se va penetrando en la región señalada en la geografía peruana como *ceja de selva*, donde se tiene un clima tropical amazónico. Esta región hidrográficamente se interrelaciona con la cuenca del río Utcubamba.

Kuélap está dividido por ocho sectores que abarcan una extensión de 450 hectáreas siendo su principal material de construcción la piedra de grandes dimensiones cuyo tipo de asentado es de canto (canteado). Dentro de los sectores, en primer lugar, está La Barreta, que representa el área de sarcófagos, entierros, andenería y áreas de residencias rurales; al lado sur, se encuentra Malcapampa, cuya zona podría corresponder a una proyección del sector La Fortaleza, no concluida, con muros y accesos.



Figura 1. Ubicación del sitio arqueológico Kuélap y su entorno.

El sector La Fortaleza (Figura 2) se localiza en la zona más alta de Kuélap, sobre una gran plataforma artificial, orientada de sur a norte, asentada sobre la cresta de roca calcárea en la cima del cerro Barreta (3.000 msnm). Esta plataforma se extiende a lo largo de casi 600 m y 110 m de ancho, tiene como perímetro una muralla que en algunos puntos alcanza 20 m de altura y ésta encierra este sector.



Figura 2. Vista panorámica de Kuélap.

Entre los años 2004 y 2011 con la contribución económica del Ministerio de Comercio Exterior y Turismo del Perú a través del Plan Copesco Nacional y el Gobierno Regional de Amazonas, se organizaron seis campañas de investigación y conservación. En este sentido se destaca las investigaciones de Narvéez (2013) donde se refiere a las excavaciones realizadas en el Templo Mayor de Kuélap, aquí describe que la función de esta edificación es de carácter religioso, con presencia de entierros humanos, ofrendas de camélidos, quemas rituales de alimentos (maíz y frejol) y cerámica dispersa.

En este contexto las investigaciones realizadas en Kuélap, no sólo abarcan arquitectura (Bradley, 2005), tenemos también estudios de diversidad natural y cultural (Leiva et al, 2019), aspectos históricos (Church y Guengerich, 2018), estudios isotópicos de óseos humanos (Toyne et al, 2020) y análisis bioarqueológicos de entierros humanos (Toyne 2014, 2015; Toyne y Narvéez, 2017).

Aquí se ha buscado incluir los estudios de la cerámica que estuvo caracterizada por tener un estilo sencillo, sin detalles y acabados prominentes, lo cual indica que fue en su mayoría de uso doméstico para preparar y servir alimentos y/o líquidos, su decoración es tosca con adornos escasos solo con algunas incisiones y/o trazados de figuras geométricas y animales como por ejemplo la serpiente, la técnica de elaboración fue mediante el enrollado con los dedos, los colores dominantes fueron el blanco, negro y gris.

Estudios sobre cerámica más completos son los de Ruiz (2009) que identifica distintos tipos: Kuélap Tosco (A, B, C, D), Kuélap Alisado Estriado, Kuélap Pulido, Kuélap Pulido Estriado, Kuélap Pintado Tosco, Alfarería Cajamarca, Kuélap Pintado Pulido, Kuélap Pulido Inciso, Alfarería Tipo Huari, Kuélap Gris Tosco, Kuélap Pintado Alisado (A, B, C), Kuélap Pintado Aplicado, y con la llegada de los incas a estas zonas se adiciona el estilo cusqueño a las formas y diseños de la cerámica, así como estilos Chimú y Cajamarca.

Las observaciones adicionales realizadas sobre la cerámica recuperada en la temporada 2010 han permitido revelar la presencia de evidencias microbotánicas adheridas al interior de un conjunto de fragmentos de cerámica en las diversas estructuras de La Fortaleza. Es así que se ha podido muestrear estas evidencias en la Estructura 31 (16 muestras); Estructura 33 (01 muestra) y Estructura 34 (04 muestras).

Se consideran evidencias microbotánicas aquellos restos vegetales microscópicos que han sobrevivido por cientos de años en los utensilios cerámicos (domésticos o rituales), ya sea en el fondo de las vasijas cerámicas o en sus paredes (en el caso de vasijas completas) o simplemente presentes en los fragmentos de las vasijas cerámicas. Esto se puede apreciar a manera de sedimentos que se presentan de diversas maneras: en la porosidad de la arcilla, en capas de diferente grosor o conformando costras carbonizadas. Estos sedimentos corresponden a una aglomeración de residuo de alimento deshidratado de color crema o blanquecino y en algunos casos de color oscuro que han quedado adheridos en el interior de las vasijas de cerámica como residuos de la cocción o que en algún momento fueron ofrendas con alimentos y que quedaron *in situ*.

Muestras con estas características similares se han observado para otros sitios arqueológicos como en: Namanchugo (Vásquez et al, 2002); Huaca Cao Viejo (Vásquez et al, 2014); Wasi Huachuma (Duke et al, 2018); Manchán (Vásquez et al, 2018), entre otros, lo que ha permitido identificar presencia de estas evidencias microbotánicas en los fragmentos de cerámica de Kuélap.

Estas evidencias microbotánicas pueden manifestarse como: almidones (polisacáridos presentes en legumbres, cereales y tubérculos), fitolitos (cristales de sílice que se presentan como células vegetales mineralizadas procedentes de las hojas o brácteas), diatomeas (algas unicelulares) y polen (granos microscópicos que producen las plantas con semillas).

El estudio de estas evidencias microbotánicas se realiza con técnicas específicas que utiliza la arqueobotánica y los datos que aportan proporcionan valiosa información directa y confiable sobre el uso de plantas, la ecología, el medioambiente y la interacción con estas plantas, en este caso de los pobladores prehispánicos de Kuélap.

Materiales y métodos

Las muestras

De una muestra de 47 fragmentos de cerámica agrupados en 21 bolsas se seleccionaron un total de 16 fragmentos teniendo en cuenta que el criterio para su selección fue elegir muestras de buena conservación en estos sedimentos, despejando aquellas muestras que se encontraron deterioradas o atacadas por microorganismos.

A continuación, se presenta en la Tabla 1, la muestra estudiada teniendo en cuenta los datos de contexto, correspondientes a la temporada 2010.

Tabla 1. Relación de fragmentos de cerámica seleccionadas con evidencias microbotánicas para el análisis de granos de almidón del sitio Kuélap, La Fortaleza, Sector Sur, Subsector Templo Mayor – Temporada 2010

KUELAP: LA FORTALEZA: SECTOR SUR: SUB SECTOR TEMPLO MAYOR: TEMPORADA 2010									
Estructura 31					Estructura 33	Estructura 34			
Unidad -VIII X					Unidad -IX W	Unidad -IX V		Unidad -IX W	
Cuadríc 22-32	Cuadríc 27-39	Cuadríc 48-49	Cuadríc 48-69	Cuadríc 78-89	Cuadríc 64	Cuadríc 6-39	Cuadríc 77-99	Cuadríc 6-39	
Nivel 1					Nivel 1	Nivel 1		Nivel 1	Nivel 2
Muestra 1 01 frag	Muestra 2 01 frag	Muestra 3 01 frag	Muestra 4 01 frag	Muestra 5 a 11 07 frag	Muestra 12 01 frag	Muestra 13 01 frag	Muestra 14 01 frag	Muestra 15 01 frag	Muestra 16 01 frag

Esta actividad y el correspondiente análisis fue realizado en el Laboratorio de Arqueobiología de la Escuela Profesional de Arqueología de la Facultad de Ciencias Sociales, Universidad Nacional de Trujillo.

Análisis ceramográfico

El objetivo fue caracterizar los fragmentos de cerámica para la identificar los tipos de pastas, temperantes, tecnología, color, función, así como filiación. En este sentido se procedió a elaborar una lista de diferentes indicadores teniendo como referencia a Manrique, 2001.

Registro fotográfico y microfotográfico

El registro fotográfico se llevó a cabo antes del análisis microbotánico, tomando fotografías a los fragmentos de cerámica por ambos lados (anverso y reverso) utilizando una escala gráfica.

El registro microfotográfico se realizó en el microscopio durante el hallazgo de los granos de almidón. Para ambos casos se utilizó una cámara digital Sony DSCW200 de 12,1 megapíxel, teniendo como escala el micrométrico al interno del microscopio.

Aislamiento de almidones mediante el análisis microscópico

El primer paso se dirigió a esterilizar todo el material de laboratorio implicado en el análisis con el fin de evitar posibles contaminaciones.

En el siguiente paso se examinó los sedimentos en los fragmentos de cerámica de las Estructuras 31, 33 y 34 para llevar a cabo la extracción de una pequeña muestra de cada fragmento. Esta consta del aislamiento de 3 a 5 gramos que fueron introducidas en viales de 15 ml a las que se les adicionó agua bidestilada estéril, para pasar a ser centrifugados con el fin de homogenizar la mezcla. Luego se extrajeron 5 alícuotas del sobrenadante de 0,1 ml de cada vial para añadirlos en tubos Eppendorf de 1,5 ml y hacer diluciones de 1:5, 1:10 y 1:15. El mismo protocolo se cumplió para cada muestra.

Las muestras diluidas se observaron al microscopio para definir cuál dilución era la óptima. Así, dos gotas de cada solución formada fueron puestas en una luna portaobjetos y disueltas en dos gotas de solución salina fisiológica al 5% y glicerina (v/v) previamente esterilizadas, para tratar de no alterar la morfología de las estructuras microscópicas presentes en la muestra. Posteriormente se hicieron observaciones a 400X para tratar de identificar bien las estructuras microscópicas de los granos de almidón que estaban presentes en las muestras adheridas al interior de los sedimentos del fragmento cerámico y lítico, tomándose en consideración datos básicos morfológicos tales como forma, posición del hilum, facetas, patrones de fisuras, lamellas, entre las más importantes.

Identificación de los granos de almidón: microscopía de luz simple y de luz polarizada

Para la identidad taxonómica de los granos de almidón se procedió a la observación microscópica ya que éstos se presentan como pequeños gránulos con diversas morfologías: redondos, ovalados, arriñonados, poligonales, lenticulares, etc.; tamaños diferentes: pequeños, grandes; variada agrupación: individuales, agrupados, montados, etc., variando según su identidad taxonómica, procesamiento y tafonomía.

En esta fase se contó con el apoyo de una muestra comparativa que fue proporcionada por el Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas "ARQUEOBIOS" la cual consta de una colección de láminas con montaje de granos de almidón y fitolitos de especies modernas de cultivos de raíces, tuberosas, cereales y leguminosas andinas, gramíneas silvestres nativas y árboles, como material comparativo. Además, fue proporcionada bibliografía especializada

con claves taxonómicas y trabajos relacionados: Reichert, 1913; Loy, 1990; Piperno, 2006; Torrence y Barton, 2006, Guevara, 1973.

Para verificar la autenticidad y presencia de granos de almidón en el análisis microscópico con luz simple, se empleó microscopía de luz polarizada. La luz polarizada se utiliza típicamente para detectar la presencia de los cuerpos del almidón. Con luz polarizada, los granos del almidón demuestran una figura de interferencia en la forma de una "cruz" (cruz de Malta), lo cual es el resultado de la doble refracción de la luz a través de las estructuras laminares cilíndricas o esféricas que presentan los granos del almidón. El punto de la intersección de las dos partes de la cruz corresponde generalmente a la posición del hilum. Este es una abertura o sección transversal del tubo o pasaje hacia el interior del grano, y por la cual la materia amilácea, forma la lámina interna que traspasa. Así, un examen microscópico de los granos de almidón con el microscopio de polarización es una evidencia inequívoca que su doble poder refractivo puede ser obtenido y confirmar su presencia.

Se tomaron medidas de los granos de almidón identificados, mediante un dispositivo o retículo de medición calibrado a micras (μ), que fue acoplado al ocular del microscopio. Se tomaron como medidas el largo máximo (L) y el ancho máximo (A) de cada grano de almidón identificado y de aquellos no identificados. Los granos de almidón identificados mediante características morfológicas, microscopía de polarización y posteriormente medidos en micras en su largo y ancho, fueron registrados con una cámara digital CANON EOS Rebel T5i de 18 megapíxel. Posteriormente las imágenes obtenidas fueron otra vez analizadas en una computadora para su verificación. Todos los datos obtenidos fueron ingresados en una hoja de cálculo Excel 2019.

Resultados

Análisis microscópicos

A continuación, se presentan en la Tabla 2 los datos obtenidos de los análisis microscópicos para 16 muestras de fragmentos de cerámica con sedimentos adheridos que provienen de tres estructuras de Kuélap: Estructura 31, Estructura 33 y Estructura 34, presentando la identificación taxonómica de los granos de almidón identificados: *Manihot esculenta* "yuca" y *Zea mays* "maíz", así como sus medidas y características.

Tabla 2. Granos de almidón aislados de los sedimentos adheridos al interior de fragmentos de cerámica de Kuélap

N° Muestra	Estructura Unidad	Cuadric	Nivel	Contexto	Taxón	Medidas		Observaciones
						L (μ)	A (μ)	
1	E: 31 U: -VIII X	22-32	1	Escombro Ext. C/A	<i>Zea mays</i>	20.8	18.2	almidón poliédrico
						18.2	13.0	almidón poliédrico
						20.8	20.8	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						20.8	18.2	almidón poliédrico
						20.8	18.2	almidón poliédrico
						13.0	13.0	izq= almidón poliédrico
						18.2	13.0	der= almidón poliédrico
2	E: 31 U: -VIII X	27-39	1	Escombro Ext. C/B	<i>Zea mays</i>	20.8	20.8	almidón poliédrico
						15.6	13.0	almidón poliédrico
						13.0	13.0	almidón poliédrico
						20.8	18.2	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						20.8	20.8	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
					<i>Manihot esculenta</i>	13.0	10.4	almidón hemiesférico
3	E: 31 U: -VIII X	48-49	1	Escombro Ext. C/B	<i>Zea mays</i>	20.8	18.2	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						15.6	13.0	almidón poliédrico
						20.8	20.8	almidón poliédrico
						18.2	15.6	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						18.2	18.2	almidón poliédrico
						18.2	15.6	almidón poliédrico
					<i>Manihot esculenta</i>	13.0	13.0	almidón hemiesférico
					15.6	13.0	abajo: almidón hemiesfético	
					15.6	15.6	arriba: almidón hemiesfético	
4	E: 31 U: -VIII X	48-69	1	Escombro Ext. C/C	<i>Manihot esculenta</i>	15.6	13.0	almidón hemiesférico
						23.4	20.8	almidón hemiesférico
						18.2	18.2	almidón hemiesférico
						23.4	20.8	almidón hemiesférico
						18.2	18.2	almidón hemiesférico
					<i>Zea mays</i>	18.2	15.6	almidón poliédrico
					20.8	20.8	almidón poliédrico	
					20.8	20.8	almidón poliédrico	
5	E: 31 U: -VIII X	78-89	1	Escombro Ext. C/C	<i>Zea mays</i>	15.6	13.0	almidón poliédrico
						18.2	18.2	almidón poliédrico
						18.2	18.2	almidón poliédrico
						18.2	18.2	almidón poliédrico
						10.4	10.4	almidón poliédrico
6	E: 31 U: -VIII X	78-89	1	Escombro Ext. C/C	<i>Zea mays</i>	18.2	15.6	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						20.8	18.2	almidón poliédrico
						18.2	18.2	almidón poliédrico
						18.2	13.0	almidón poliédrico
7	E: 31 U: -VIII X	78-89	1	Escombro Ext. C/C	<i>Zea mays</i>	13.0	13.0	almidón poliédrico
						20.8	20.8	almidón poliédrico
						18.2	18.2	almidón poliédrico
					<i>Manihot esculenta</i>	15.6	13.0	almidón hemiesférico
					15.6	13.0	almidón hemiesférico	
					No identificados	NM	NM	almidones gelatinizados
					20.8	15.6	almidones elíptico-trapezoide	

Tabla 3. Granos de almidón aislados de los sedimentos adheridos al interior de fragmentos de cerámica de Kuélap

N° Muestra	Estructura Unidad	Cuadric	Nivel	Contexto	Taxón	Medidas		Observaciones
						L (μ)	A (μ)	
8	E: 31 U: -VIII X	78-89	1	Escombros Ext. C/C	<i>Zea mays</i>	18.2	18.2	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						20.8	18.2	almidón poliédrico
						18.2	15.6	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
					18.2	18.2	almidón poliédrico	
					<i>Manihot esculenta</i>	23.4	20.8	almidón poliédrico
9	E: 31 U: -VIII X	78-89	1	Escombros Ext. C/C	<i>Zea mays</i>	18.2	15.6	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						15.6	13.0	almidón poliédrico
						20.8	15.6	almidón poliédrico
					18.2	18.2	almidón hemiesférico	
					<i>Manihot esculenta</i>	15.6	15.6	almidón hemiesférico
10	E: 31 U: -VIII X	78-89	1	Escombros Ext. C/C	<i>Manihot esculenta</i>	18.2	15.6	almidón hemiesférico
					<i>Zea mays</i>	18.2	15.6	almidón poliédrico
						20.8	18.2	almidón poliédrico
						15.6	13.0	izq.= almidón poliédrico
						26.0	26.0	der.= almidón poliédrico
15.6	15.6	almidón poliédrico						
11	E: 31 U: -VIII X	78-89	1	Escombros Ext. C/C	<i>Zea mays</i>	15.6	15.6	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						20.8	18.2	almidón poliédrico
						13.0	13.0	almidón poliédrico
						18.2	18.2	almidón poliédrico
				<i>Manihot esculenta</i>	18.2	18.2	almidón hemiesférico	
12	E: 33 U: -IX W	64	1	Escombros Int. C/C	<i>Manihot esculenta</i>	14.3	13.0	almidón hemiesférico
					<i>Zea mays</i>	15.6	13.0	almidón poliédrico
						15.6	13.0	almidón poliédrico
13	E: 34 U: -IX V	6-39	1	Escombros Int. C/A	<i>Zea mays</i>	13.0	13.0	almidón poliédrico
						26.0	26.0	almidón poliédrico
					<i>Manihot esculenta</i>	13.0	13.0	almidón hemiesférico
						10.4	10.4	almidones hemiesféricos dentro parénquima reserva
14	E: 34 U: -IX V	77-99	1	Escombros Int. C/A	<i>Zea mays</i>	18.2	15.6	almidón poliédrico
						18.2	15.6	almidón poliédrico
						15.6	15.6	almidón poliédrico
						15.6	13.0	almidón poliédrico
					<i>Manihot esculenta</i>	15.6	15.6	almidón poliédrico
15.6	15.6	almidón poliédrico						
15	E: 34 U: -IX W	6-39	1	Escombros Int. C/A	<i>Zea mays</i>	20.8	18.2	almidón poliédrico
						15.6	13.0	almidón poliédrico
						18.2	15.6	almidón poliédrico
						18.2	10.4	almidón poliédrico
						18.2	15.6	almidón poliédrico
					<i>Manihot esculenta</i>	15.6	15.6	almidón hemiesférico
16	E: 34 U: -IX W	6-39	2	Int. Banqueta C/A	<i>Zea mays</i>	15.6	13.0	almidón poliédrico
						13.0	13.0	almidón poliédrico
						15.6	13.0	almidón poliédrico
					<i>Manihot esculenta</i>	13.0	13.0	almidón hemiesférico

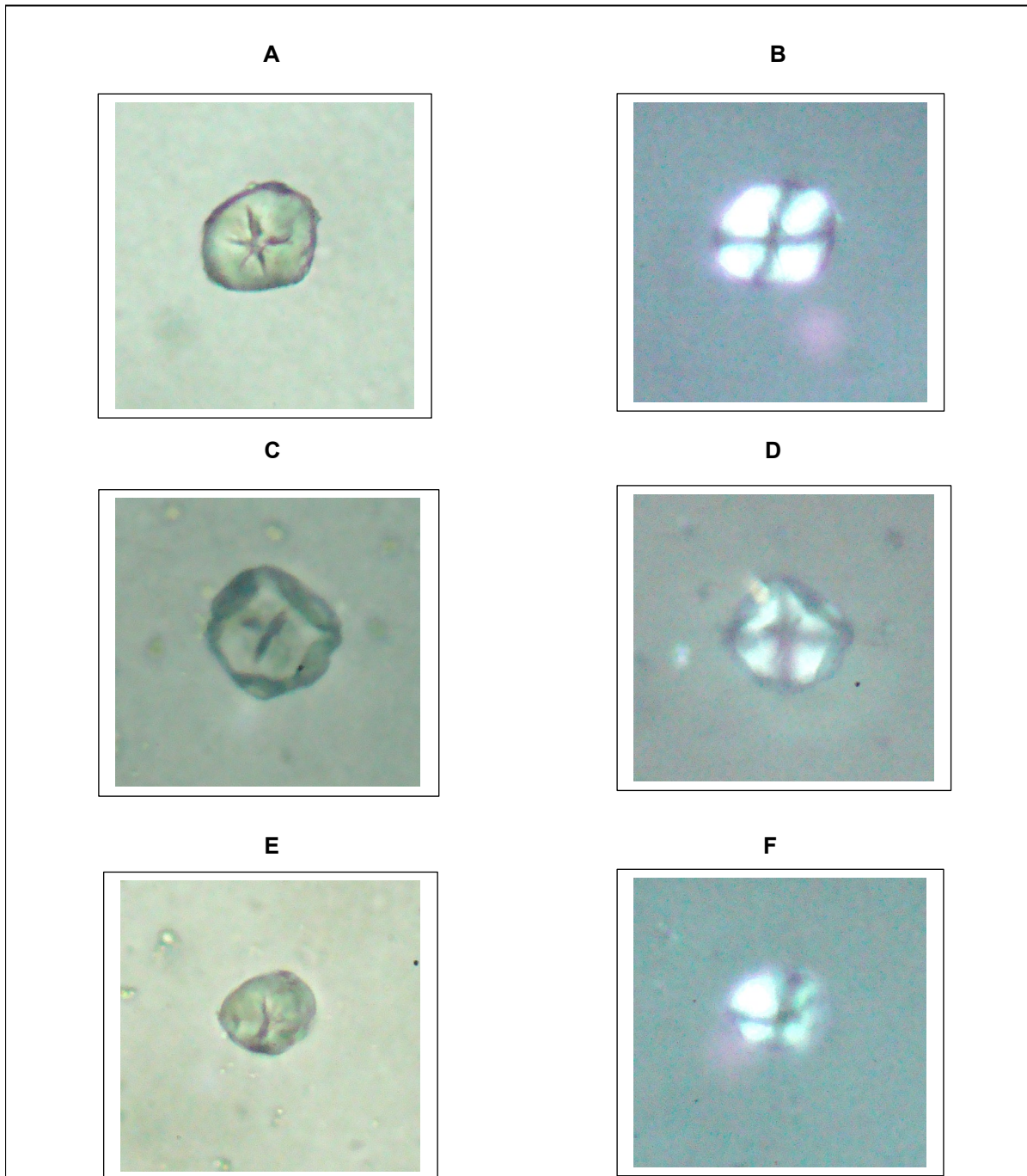


Figura 3: (A) Grano de almidón de *Zea mays* de forma poliédrica, mide 20.8 μ de largo por 20.8 μ de ancho, procede de la muestra 1, Estructura 31, captura con microscopio de luz simple a 400X (B) El mismo grano de almidón con captura de microscopio con luz polarizada a 400X (C) Grano de almidón de *Zea mays* de forma poliédrica, mide 20.8 μ de largo por 20.8 μ de ancho, procede de la muestra 2, Estructura 31, captura con microscopio de luz simple a 400X (D) El mismo grano de almidón anterior con captura de microscopio con luz polarizada a 400X, (E) Grano de almidón de *Zea mays* de forma poliédrica, mide 15.6 μ de largo por 15.6 μ de ancho, procede de la muestra 4, Estructura 31, captura con microscopio de luz simple a 400X (F) El mismo grano de almidón pero con captura de microscopio de luz polarizada a 400X.

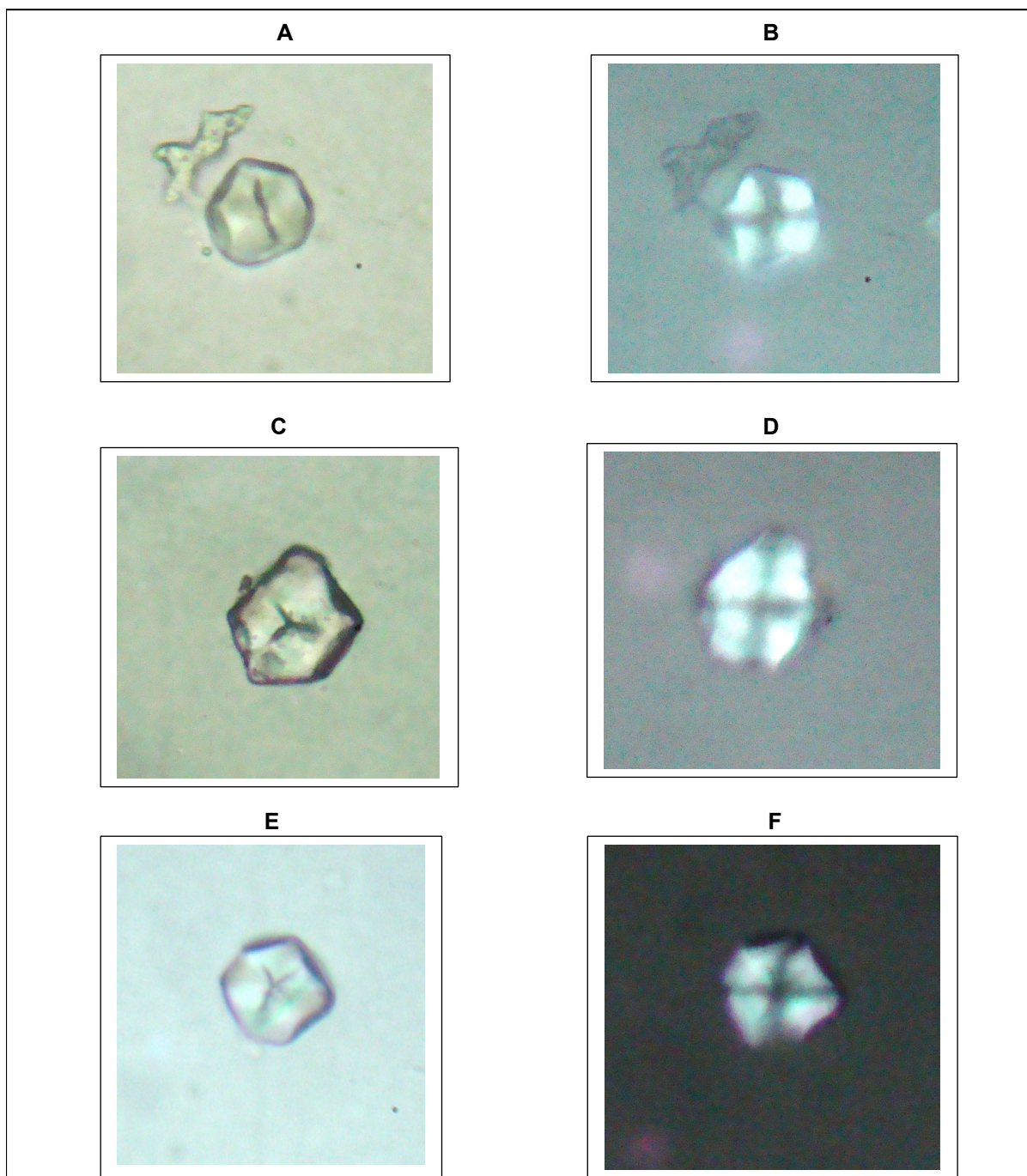


Figura 4: (A) Grano de almidón de *Zea mays* “maíz” de forma poliédrica, mide 18.2 μ de largo por 18.2 μ de ancho, procede de la muestra 6, Estructura 31, captura con microscopía de luz simple a 400X, (B) El mismo grano de almidón anterior, con captura de microscopía de luz polarizada a 400X, (C) Grano de almidón de *Zea mays* “maíz” de forma poliédrica, mide 20.8 μ de largo por 20.8 μ de ancho, procede de la muestra 9, Estructura 31, captura con microscopía de luz simple a 400X, (D) El mismo grano de almidón anterior, con captura de microscopía de luz polarizada a 400X, (E) Grano de almidón de *Zea mays* “maíz” de forma poliédrica, mide 18.2 μ de largo por 18.2 μ de ancho, procede de la muestra 14, Estructura 31, captura con microscopía de luz simple a 400X, (F) El mismo grano de almidón anterior, con captura de microscopía de luz polarizada a 400X.

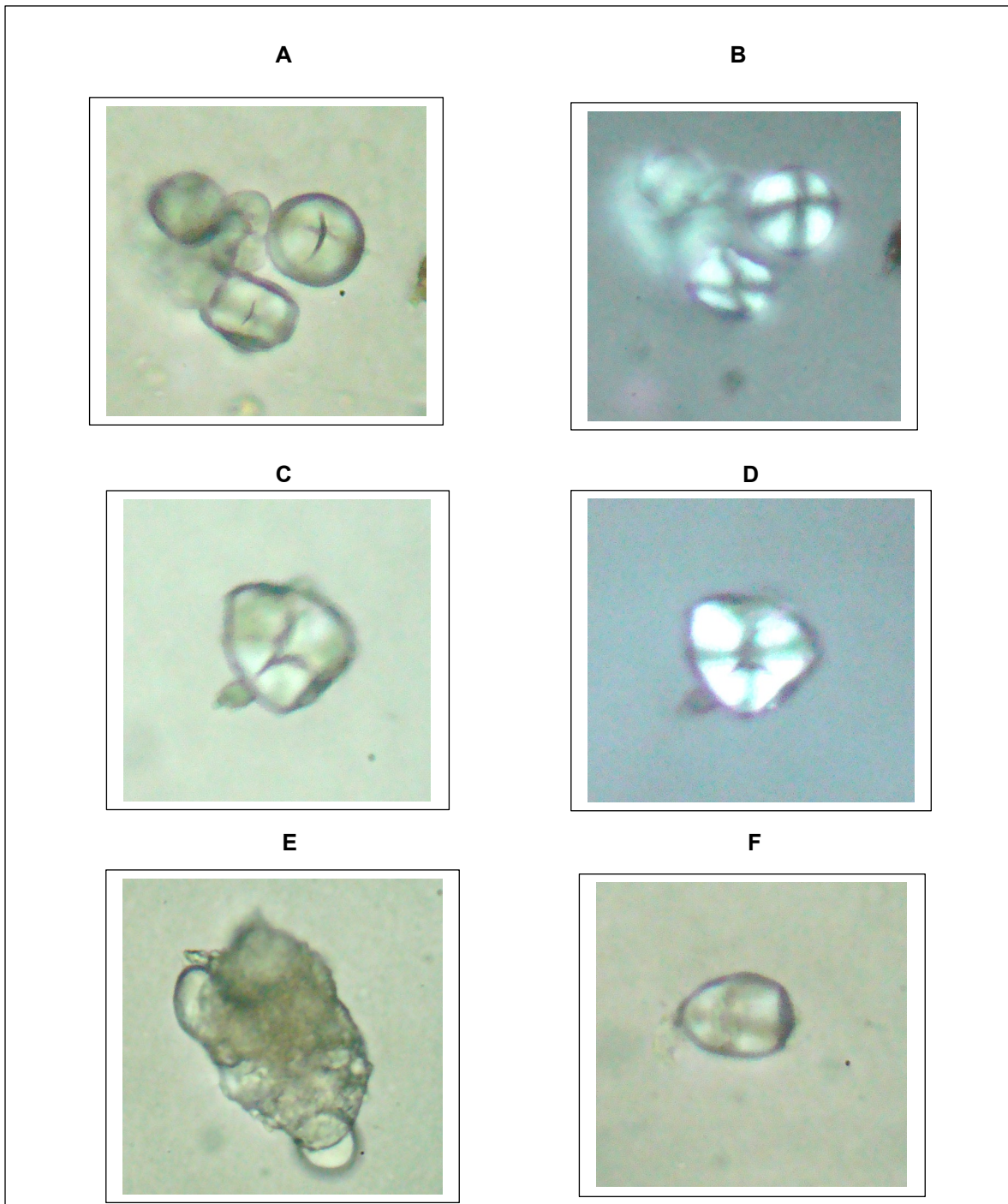


Figura 5: (A) Granos de almidón de *Manihot esculenta* “yuca” de forma hemiesférica, el grano en primer plano mide 15.6μ de largo por 15.6μ de ancho, procede de la muestra 4, Estructura 31, captura con microscopía de luz simple a 400X, (B) Grano de almidón anterior con captura de luz polarizada a 400X, (C) Grano de almidón de *Manihot esculenta* “yuca” de forma triangular, mide 23.4μ de largo por 20.8μ de ancho, procede de la muestra 5, Estructura 31, captura con microscopía de luz simple a 400X, (D) Grano de almidón anterior con captura de luz polarizada a 400X, (E) Granos de almidón gelatinizados, dentro del parénquima de reserva, procede de la muestra 7, Estructura 31, captura con microscopio de luz simple a 400X (F) Granos de almidón No Identificado, de forma elíptica-trapezoide, mide 20.8μ de largo por 15.6μ de ancho, procede de la muestra 7, Estructura 31, captura con microscopía de luz simple a 400X.

Análisis cerámico

Se analizó 21 bolsas de cerámica con un total de 47 fragmentos, de éstos se describe el tipo de fragmento, tipo de pasta, característica de su superficie, espesor, dureza, tomando la metodología de Manrique 2001 y los estudios de cerámica de Kuélap de Ruíz, 2009.

Los resultados se presentan en las siguientes tablas:

Tabla 4. Clasificación de las muestras cerámicas con sedimentos adheridos por características de sus pastas

Características de la cerámica por sus pastas		
Temperante	Medianamente tosco	21
Textura	Granuloso	21
Consistencia	Semicompacta	21
Color	Anaranjado	9
	Anaranjado rojizo	2
	Negro en el núcleo, extremos anaranjado rojizo	2
	Gris en el núcleo, extremos anaranjado rojizo	6
	Marrón	1
	Gris	1
Cocción	Reductora	13
	Oxidante	8

Tabla 5. Clasificación de las muestras cerámicas con sedimentos adheridos por su superficie

Clasificación de la cerámica por su superficie			
Color	Anaranjado marrón		2
	Anaranjado rojizo		4
	Gris con engobe negro		1
	Marrón con engobe negro		1
	Anaranjado rojizo con engobe plomo		5
	Anaranjado rojizo con engobe negro		4
	Anaranjado rojizo con engobe marrón		3
	Gris		1
Tratamiento	Exterior	tosco con estrías marcadas	2
		tosco con estrías marcadas	1
	Interior	tosco con estrías marcadas	2
		fractura irregular	1

Tabla 8. Clasificación de la cerámica con sedimentos adheridos por su espesor

Clasificación de la cerámica por espesor	
0 - 0.5 cm	16
0.55 - 0.90 cm	5

Discusión

Estudios sobre análisis de almidones en sedimentos adheridos a fragmentos de cerámica de Kuélap no han sido realizados para el sitio, y este estudio constituye el primer reporte sobre este tipo de análisis. Se han analizado 16 muestras (fragmentos de cerámica), de los cuales 11 muestras (fragmentos) proceden de la Estructura 31; una muestra (fragmento) de la Estructura 33 y cuatro muestras (fragmentos) proceden de la Estructura 34. De estas muestras se han identificado dos especies de plantas cultivadas, *Zea mays* “maíz” y *Manihot esculenta* “yuca”. No se han identificado otras especies de plantas cultivadas, y en este caso no se identificó ningún almidón de *Solanum tuberosum* “papa” u otras plantas ricas en almidones.

La identidad de los granos de almidón antiguos

Conocemos lo complicado que resulta identificar y diferenciar un grano de almidón de una especie de origen arqueológico en relación con otra, porque por un lado se tiene como desventajas, el tiempo, los procesos hidrolíticos, el efecto de la temperatura, la composición química intrínseca y encontrar estos precisamente en la fase intermedia de su vida (Guevara, 1973; Piperno, 2006).

Sin embargo, es probable que la composición química y algunos aspectos tafonómicos peculiares a los cuales estuvieron sometidos los granos de almidón, como es el caso para el maíz y yuca, así como la forma de consumo de estos y su contacto permanente con las vasijas, hayan contribuido para que algunos granos de almidón hayan conservado por varias centurias, una buena morfología y en algunos casos se pueda observar granos típicos de las especies identificadas (ver Figuras 3, 4 y 5).

***Zea mays* “maíz”**

En relación con los granos de almidón de maíz aislados, hemos aislado un total de 77 granos de almidón, de los cuales todos son granos de almidón poliédricos, y provienen del consumo de razas vítreas (ver Figuras 3A, 3C, 3E, 4A, 4C y 4E), lo cual existe también en otros estudios de fragmentos de cerámica de sitios andinos y de la selva, como son el caso de Luya, que fue excavado dentro del proyecto arqueológico Jucusbamba, por Klaus Koschmieder (Koschmieder, 2012). En cerámica de Luya, los sedimentos de estos fragmentos de cerámica, también arrojaron múltiples evidencias de granos de almidón de “maíz”, los cuales también fueron de forma poliédrica y por lo tanto de razas vítreas (Koschmieder, 2012).

La alta proporción de granos de almidón de maíz en los sedimentos de fragmentos de cerámica de Kuélap, confirman que este cultivo alcanzo una relevancia notable, teniendo en cuenta la característica ceremonial del sitio. La cerámica doméstica del sitio se encontró esparcida en las tres estructuras (E31, E33 y E34), lo que permitió inferir que se realizaban ceremonias donde se consumía maíz,

posiblemente como una mazamorra, conocida como *sanco*, el cual se prepara con la harina del maíz y grasa de algún animal herbívoro, hasta obtener una especie de mazamorra. Las citas históricas indican que en tiempos prehispánicos se realizaba la molienda de maíz en un batán, se obtenía la harina que se utilizaba en la elaboración de tortillas, sango, coladas o mazamorras variables como el *sango*, donde además se utilizaba sangre y grasa de camélido para consolidar esta mazamorra ceremonial, que se consumía en estas ceremonias (Acosta, 1954:109).

Por otro lado, también está la posibilidad de preparación de chicha (bebida alcohólica en base a maíz) la cual habría servido para las libaciones que habrían ocurrido en las fiestas ceremoniales del sitio. Por tanto, esta alta cantidad de almidones de maíz solo confirma la importancia y estatus del sitio, teniendo en cuenta que el maíz fue un cultivo utilizado por las altas clases sociales y en las ceremonias de sitios importantes en tiempos prehispánicos.

***Manihot esculenta* “yuca”**

Los granos de almidón de “yuca” han sido aislados de las muestras 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 (tablas 2 y 3). Se trata de almidones de forma hemiesférica, los cuales se han encontrado mayoritariamente en formas individuales y también en grupos como se observa en la figura 3A. Por las características de su cultivo que se realiza entre 1.050 y 2.800 msnm, y siendo que Kuélap está ubicada a una altitud de 3000 msnm, este cultivo es posible que fue cultivado también en los alrededores del sitio, o también la posibilidad que haya sido importado al sitio desde los valles interandinos adyacentes. Estos granos de almidón tienen formas diferentes a los almidones de yuca de la costa y de la selva, por lo que se trata de yucas adaptadas a valles interandinos, tampoco se trataría de yucas silvestres, porque estas tienen granos de almidón de menor tamaño a las observadas para estos materiales.

Por la ocurrencia de los almidones de yuca con los de maíz en una misma muestra, existe evidencia que ambos cultivos hayan sido preparados en las mismas ollas, lo cual indica que estas habrían sido utilizadas para la preparación cotidiana de este tipo de menús. La figura 5A, muestra un grupo de almidones que se encuentran dentro de parénquima de reserva. Esta característica indica que, para consumir la yuca, se habría elaborado una masa almidonosa para consumirla como *Cazabe*, una especie de tortilla cocida, o también posiblemente hayan preparado alguna bebida fermentada. Ambas posibilidades son óptimas para considerarse.

Finalmente, el análisis de los fragmentos de cerámica con sedimentos adheridos y por las características descritas y asociando con los datos de Ruíz (2009), se puede inferir que estos podrían pertenecer a partes de cántaros pequeños que tenían la función de almacenar líquidos y preparar alimentos, ya sean de maíz y/o

yuca, ya que sus características morfológicas así lo evidencian. Por otro lado, las medidas morfológicas evidencian que también se cuentan con fragmentos que pertenecía a partes de urpos y ollas, lo que hace afirmar que también tenían la función de almacenar líquidos, así como también para la cocción de tortillas de maíz y/o yuca.

Conclusiones

La muestra de 16 fragmentos de cerámica cuyos sedimentos internos analizados, permiten indicar que el maíz y la yuca fueron los principales alimentos vegetales consumidos en Kuélap han permitido inferir que, por la forma poliédrica de los almidones de maíz, se trataban de razas de maíz de endospermo vítreo. Los granos de este maíz debieron ser molidos para obtener una masa almidonosa que sirvió para preparar una mazamorra conocida como *sanco*, la cual la habrían consumido en sus fiestas ceremoniales.

En relación con la yuca, hay una coincidencia en 13 muestras (fragmentos de cerámica) donde están conjuntamente con almidones de maíz. Aunque los almidones de maíz fueron en cantidad los mayormente aislados de los sedimentos de todas las muestras, los granos de almidón de yuca también están representados, lo que implicaría una utilidad dual de las vasijas donde se prepararon alimentos o bebidas fermentadas en base a los almidones de estos dos cultivos. La presencia de almidones de yuca, pueden indicar una influencia de costumbres selváticas en Kuélap, por lo menos en base a este cultivo.

Referencias bibliográficas

- Acosta J (1954): *Historia Natural y Moral de las Indias* (1950). Ed. Atlas, Madrid 1954. 631 pág. (Biblioteca de Autores Españoles – 73).
- Bradley R (2005): *The architecture of Kuelap*. Tesis Doctoral, Columbia University. New York.
- Church W, Guengerich A (2018): La (re)construcción de Chachapoyas a través de la historia e histografía. *Boletín de Arqueología PUCP* (23): 5-38.
- Duke G, Vásquez V, Rosales T (2018): Starch grain evidence of potato consumption at the Late Moche (AD 600-850) site of Wasi Huachuma, Perú. *Journal Archaeological Science* 100: 74-79.
- Guevara H (1973): Morfología de granos de almidón de raíces y tubérculos alimenticios más comunes. *Rebiol* 2 (2): 145-153. Universidad Nacional de Trujillo.

- Koschmieder K. (2012): Jucusbamba. Investigaciones arqueológicas y motivos Chachapoya en el norte de la Provincia de Luya, Departamento Amazonas, Perú. Impreso en Tarea Asociación Gráfica. 174 pág.
- Leiva S, Rodríguez E, Pollack L, Briceño J, Jiménez J, Gayoso G, Saldaña I, Barrera M, Mondragón E, Ángeles W, Gamarra O, Rascón J (2019): Diversidad natural y cultural del Complejo Arqueológico Kuélap (provincia Luya, región Amazonas): la fortaleza de los hombres de las nubes. *Arnaldoa* 26 (3): 883-930.
- Loy TH (1990): Prehistoric organic residues: recent advances in identification, dating, and their antiquity. *Archaeometry '90*: 645-656. Ed. Ernst Pernicka. Basel, Boston. Springer Verlag.
- Manrique E (2001): *Guía para un estudio y tratamiento de cerámica precolombina*. CONCYTEC. Lima.
- Narváez A (2013): Kuélap: una ciudad fortificada en los andes nororientales de Amazonas, en F. Kauffman-Doig (ed.), *Los Chachapoyas*, 87-160, BCP Colección de Arte y Tesoros del Perú, Lima.
- Piperno DR (2006): Identifying Manioc (*Manihot esculenta* Crantz) and other crops in Pre-Columbian Tropical America through Starch Grain Analysis: A Case Study from Central Panama. In: *Documenting Domestication New Genetic and Archaeological Paradigms* Edited by Melinda A. Zeder, Daniel G. Bradley, Eve Emshwiller, and Bruce D. Smith. Chapter 5: 46-67.
- Reichert ET (1913): The Differentiation and Specificity of Starches in relation to Genera, Species, etc. Stereochemistry applied to Protoplasmic Processes and Products, and as a Strictly Scientific Basis for the Classification of Plants and Animals. Carnegie Institution of Washington. Washington, D.C.
- Ruiz A (2009): Sobre las formas de sepultamiento prehispánico en Kuélap, Amazonas. *Arqueología y Sociedad* (20): 41-56.
- Torrence R, Barton H (2006): *Ancient Starch Research*. Left Coast Press. 256 pp.
- Toyne JM (2014): You can trepan if you want to or you can leave your skull alone: patterns in ancient cranial surgery at Kuelap, Chachapoyas, Peru, *American Journal of Paleopathology* 8: 29-35.
- Toyne JM (2015): Variation in large ectocranial lesions from pre-columbian Kuélap, Peru, *International Journal of Paleopathology* 11: 30-44.

- Toyne JM, Narváez A (2017): Un análisis bioarqueológico de los entierros en Kuélap, un acercamiento a los patrones de morfología y vida. *Boletín de Arqueología PUCP* (23): 159-186.
- Toyne JM, Michell S, Denierio M, Narváez A (2020): Examining pre-Hispanic human and animal isotopic variation at Kuelap in the eastern montane of Peru. *Quaternary International*. Vol. 548: 57-70.
- Vásquez V, Franco R, Rosales T (2014): Almidones antiguos del cálculo dental de un entierro mochica de la Huaca Cao Viejo, Complejo Arqueológico El Brujo, costa norte del Perú. *Revista Archaeobios* N° 8, Vol. 1: 6-16.
- Vásquez V, Topic J, Rosales T (2002): Restos de granos de almidón en fragmentos de cerámica de Namanchugo y Cerro Icchal, San José de Porcón, Santiago de Chuco, La Libertad. *Boletín de Lima* N° 129: 63-76. Editorial Los Pinos. Lima.
- Vásquez V, Valle L, Rosales T, Rey I, Dorado G (2018): Pruebas isotópicas, microscópicas y de artefactos de preparación y de almacenamiento de chicha en Manchán (Casma, Perú). *Revista Archaeobios* N° 12, Vol.1: 4-17.



A high-magnification microscopic image of a tissue section, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows a dense population of cells with dark, stained nuclei and lighter, eosinophilic cytoplasm and extracellular matrix. The overall appearance is that of a cellular, possibly epithelial or connective tissue, structure. The text "ARTÍCULOS DE REVISIÓN" is superimposed in the center of the image.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Archaeology and phylogeny to ascertain the evolution of amniotic egg and viviparity – Review

Gabriel Dorado ¹, Fernando Luque ², Francisco José Esteban ³, Plácido Pascual ⁴, Inmaculada Jiménez ⁵, Francisco Javier S. Sánchez-Cañete ⁶, Patricia Raya ⁷, Teresa E. Rosales ⁸, Víctor F. Vásquez ⁹, Pilar Hernández ¹⁰

¹ Author for correspondence, Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba (Spain), eMail: <bb1dopeg@uco.es>; ² Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 395, 14071 Córdoba; ³ Servicio de Informática, Edificio Ramón y Cajal, Campus Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁴ Laboratorio Agroalimentario de Córdoba, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 14004 Córdoba; ⁵ IES Puertas del Campo, Avda. San Juan de Dios 1, 51001 Ceuta; ⁶ EE.PP. Sagrada Familia de Baena, Avda. Padre Villoslada 22, 14850 Baena (Córdoba); ⁷ Dep. Radiología y Medicina Física, Unidad de Física Médica, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁸ Laboratorio de Arqueobiología, Avda. Juan Pablo II s/n, Universidad Nacional de Trujillo, 13011 Trujillo (Perú); ⁹ Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas Arqueobios, C/. Martínez de Compañón 430-Bajo 100, Urbanización San Andrés, 13008 Trujillo (Perú); ¹⁰ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba.

Abstract

Which came first, the chicken or the egg? That is not a pun, joking or irrelevant question. Two hypotheses have tried to answer it. The first, and accepted for years, proposes that the evolutionary process went from oviparity, through an Embryonic Retention (ER) phase, to viviparity. In other words, the simpler egg came first, which hatched into the more complex chicken. That is known as the terrestrial model. Indeed, fishes typically lay eggs, albeit some sharks are viviparous. Even some living (extant) mammals are oviparous, (monotremes like platypus and echidnas). But new evidence has challenged such traditional view, proposing that it was the other way round. Thus, first came the chicken, which eventually laid the egg. That is the Extended Embryo-Retention (EER) model. In the first evolutionary step of this scenario, ancient reptiles, birds and mammals gave birth to offspring. Subsequently, some of them developed oviparity. Indeed, several archaeological and phylogenetic discoveries have shown that first, during the ER period, thin layers of tissues (extraembryonic membranes) evolved for a better development of the embryo, given rise to the amniotes. It is known that living reptiles (like crocodiles and turtles) and birds typically show non-EER oviparity. But curiously, most lizards, snakes and mammals exhibit oviparity with EER or viviparity. While the debate continues, both archaeology and molecular biology will contribute to clarify this interesting topic.

Key words: Dendrogram, embryogenesis, ontogeny, mother, fetus, interactions, antagonistic, *Ikechosaurus*.

Resumen

¿Qué fue primero, el huevo o la gallina? No se trata de un juego de palabras, una broma o una pregunta irrelevante. Dos hipótesis han intentado responderlo. La primera, y aceptada desde hace años, propone que el proceso evolutivo pasó de la oviparidad, a través de una fase de Retención Embrionaria (RE), a la viviparidad. En otras palabras, primero surgió el huevo más simple, que eclosionó en el pollo más complejo. Es lo que se conoce como modelo terrestre. De hecho, los peces suelen poner huevos, aunque algunos tiburones son vivíparos. Incluso algunos mamíferos vivos (extantes) son ovíparos (monotremas como los ornitorrincos y los equidnas). Pero nuevas pruebas han puesto en entredicho esta visión tradicional, proponiendo que fue al revés. Así, primero fue la gallina, que acabó poniendo el huevo. Este es el modelo de la Retención Embrionaria Extendida (REE). En el primer paso evolutivo de este escenario, los antiguos reptiles, aves y mamíferos eran vivíparos. Posteriormente, algunos de ellos desarrollaron la oviparidad. De hecho, varios descubrimientos arqueológicos y filogenéticos han demostrado que primero, durante el periodo RE, desarrollaron finas capas de tejidos (membranas extraembrionarias) para un mejor desarrollo del embrión, dando lugar a los amniotas. Se sabe que los reptiles vivos (como cocodrilos y tortugas) y las aves muestran típicamente oviparidad sin REE. Pero curiosamente, la mayoría de los lagartos, serpientes y mamíferos presentan oviparidad con REE o viviparidad. Mientras continúa el debate, tanto la arqueología como la biología molecular contribuirán a aclarar este interesante tema.

Palabras clave: Dendrograma, embriogénesis, ontogenia, madre, feto, interacciones, antagónico, *Ikechosaurus*.

Introduction

Traditionally, archaeology and molecular biology pertained to completely separated scientific areas. Fortunately, such scenario changed with the development of in vitro amplification systems and massively-parallel nucleic-acid sequencing platforms. Other areas contributing to such breakthrough were metabolomics, proteomics and stable-isotope research. All that has opened the door to new exciting studies, allowing to decipher previously intractable enigmas. That applies not only to extant (currently living), but even to extinct species. Thus, the marriage between archaeology and molecular biology has taken place, and is yielding surprising results, as we have previously shown (Dorado et al, 2007-2022).

In this scenario, there is a long-lasting evolutionary question in science, which has been graphically summarized by the following question: *which came first, the chicken or the egg?* That it is not a futile question, but a significant one. It should be clarified that this enigma relates to early amniotes. They are a group of vertebrates that undergo embryonic or fetal development within an amnion, which is a protective membrane

(whether inside an egg or not). In other words, did early reptiles, birds and mammals laid eggs, or did they give birth to their offsprings first, further evolving the capacity to produce eggs later on? Also important is to note that the word egg in this context does not mean just the female sexual cell (ovule; complementary to the male spermatozoid), but an elaborated structure with complex fetal membranes (also known as amniotic egg). Indeed, such remarkable development significantly contributed to the evolutionary success of reptiles, birds, and mammals. Fishes and amphibians are not amniotes. Sharks usually lay eggs, but some are viviparous. Whale sharks are even more curious, using both strategies: they first generate eggs, that develop inside the body of the mother, and then give birth to offsprings.

There are two hypotheses trying to answer the question about the chicken and the egg. Thus, the conventional terrestrial model involves non-Extended Embryo-Retention (non-EER) oviparity (laying hard-shelled or soft-shelled eggs), that further evolved into EER with oviparity, and eventually viviparity (giving birth to live young). That could be driven by adaptation to the dry and hot terrestrial environments, as well as to overcome antagonistic interactions between fetus and mother during EER (Romer, 1957). But other hypothesis, supported by recent archaeological discoveries, has challenged such former assumption, with the proposal of the EER with viviparity model (Hubrecht, 1910; Mossman, 1987; Lombardi, 1994; Laurin and Reisz, 1997; Laurin, 2005; Jiang et al, 2023). In such a model, initially, all amniotic animals tended to viviparity. Therefore, it was the chicken before the egg (Jiang et al, 2023).

The beauty of science is that any hypothesis can become an accepted theory, but such status only holds until a new challenging hypothesis arises, with stronger scientific support. That may be the case of the chicken/egg dilemma. In this scenario, archaeological and phylogenetic analyses have allowed to reach a surprising conclusion, showing again the power of the scientific method. The two hypotheses are summarized below (Fig. 1).

Terrestrial model: first came the egg and then the chicken

When the chicken/egg enigma was proposed, it was assumed that the obvious answer was that first came the egg, and then the chicken (Romer, 1957). Indeed, many species phylogenetically previous to amniotes lay eggs and are not viviparous. Such model was further reinforced with the surprising fact that some living mammals known as monotremes (indigenous to Australia and New Guinea) are not viviparous, but lay eggs. Currently living monotremes are the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) and four species of echidnas: Western long-beaked echidna (*Zaglossus bruijini*), Sir David's long-beaked echidna (*Z. attenboroughi*), Eastern long-beaked echidna (*Z. bartoni*) with four subspecies, and short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*).

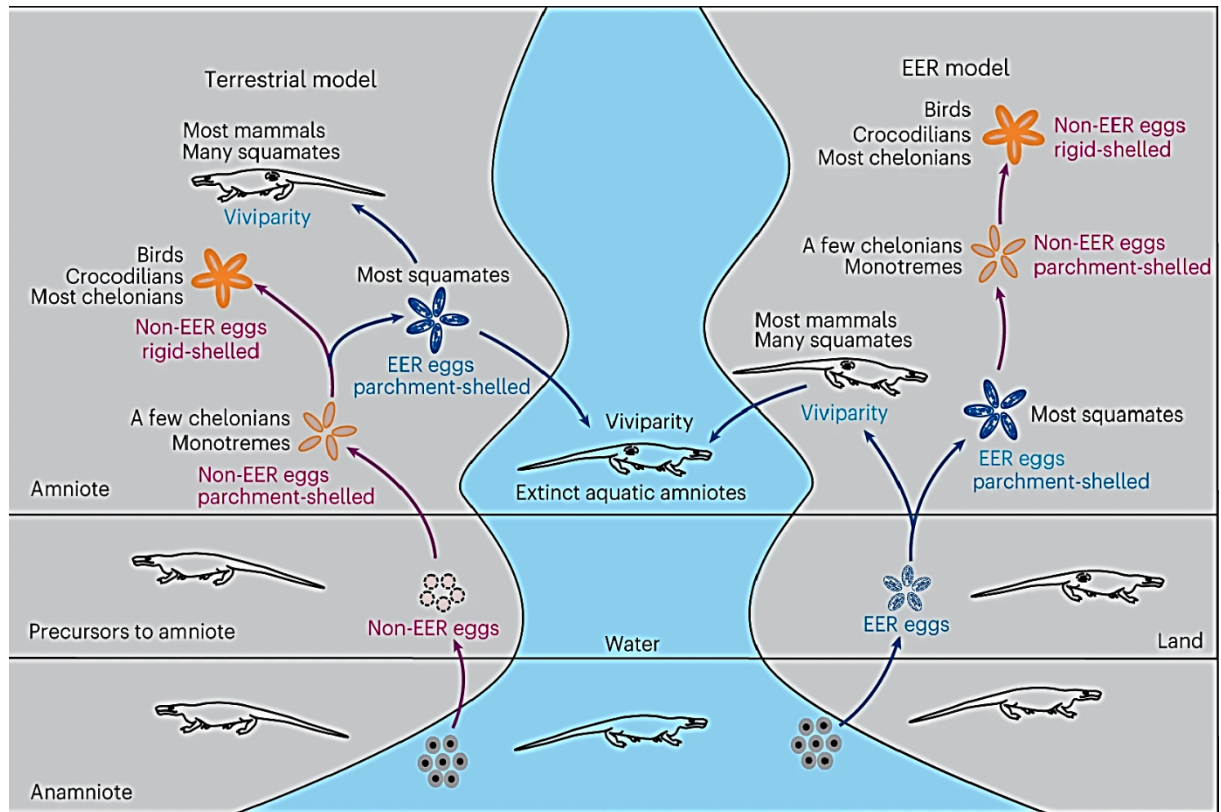


Figure 1. Two hypotheses about the evolution of the amniotic egg. The terrestrial model (left) proposes an original non-EER oviparity (purple) and further evolution towards oviparity with EER and viviparity (blue) evolving multiple times. By contrast, the EER model (right), describes the evolution of primitive EER across oviparity to viviparity (blue), with non-EER oviparity (purple) evolving multiple times. © Springer Nature (Jiang et al, 2023).

On the other hand, marsupials (native from Australasia and America) are viviparous, but do not have placenta. Therefore, they give birth to much undeveloped offsprings than placental mammals. That could be interpreted as an evolutionary step forward from oviparous mammals, but not yet as evolved as placental ones. Interestingly, surprisingly, and even shockingly, the placenta evolved from retroviral infection (Mi et al, 2000).

EER model: first came the chicken and then the egg

The previous terrestrial model has been widely accepted until recently, when archaeological and phylogenetic studies have revealed surprising results. The fossil record had previously shown that choristoderes were morphologically diverse, including lizard- or crocodile-like reptiles, as well as long-necked morphologies. They lived from the Middle Jurassic-Triassic to the Miocene periods [168 to 20, and even 11.6 million years ago (Mya)]. They were considered viviparous. Yet, an oviparous choristodere

specimen (*Ikechosaurus* sp.) from the Lower Cretaceous period (125 to 120 Mya) has been recently found in China, surprisingly containing an articulated embryo inside a parchment-shelled egg (Jiang et al, 2023).

Such remarkable discovery, together with other evidence, has been recently analyzed. That has generated a dendrogram (phylogenetic tree) of oviparity, EER and viviparity for extant and extinct amniotes. Surprisingly, it shows that the original reproduction of basal archosauromorphs was EER (including viviparity). In other words, this model proposes that the extraembryonic membranes arose to control fetal-maternal interactions during extended EER. Thus, early reptiles, birds and mammals would have given birth to their young and then, some of them, developed the ability to lay eggs. Curiously, currently living crocodiles, turtles and birds typically exhibit non-EER oviparity (laying eggs at an early developmental stage), but most lizards, snakes and mammals exhibit oviparity with EER or viviparity (Jiang et al, 2023) (Fig. 2). Even fishes like some sharks are viviparous, although they are not amniotes, as indicated before.

These findings reveal signs of embryonic retention capacity and viviparity in ancestors of all major evolutionary branches of both Amniota (lizards and relatives) and Archosauria (crocodiles, dinosaurs, and birds) clades. This way, the mother retains the young for a variable period of time, until conditions are best for survival. Therefore, instead of the hard-shelled egg being an original evolutionary success, this research points out that it was actually the EER that triggered the change.

Before the amniotes, the first tetrapods that evolved limbs from fish fins typically had amphibious habits. They lived in or near water for feeding and reproduction, like modern amphibians such as frogs, toads, and salamanders. However, this changed with the arrival of the amniotes, 320 million years ago. They emerged from the water because they developed a waterproof skin and other ways to control water loss. Among them, the amniotic egg was of paramount importance, becoming a great success. It was a kind of “private pond”, in which the developing reptile was protected from desiccation in dry and hot climates. That allowed the amniote to move away from the water’s edge, conquer and dominate terrestrial ecosystems.

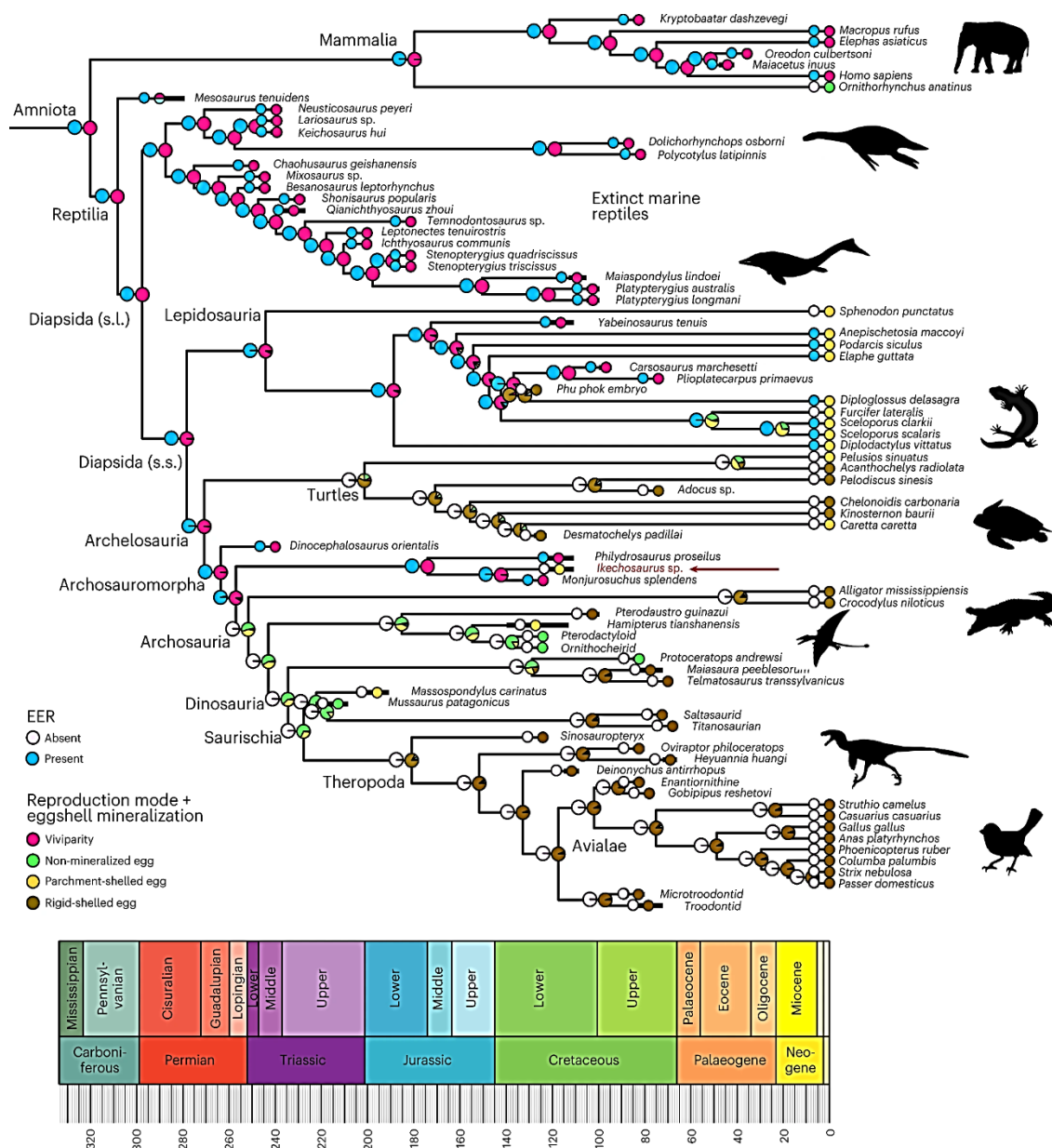


Figure 2. Phylogeny of oviparity, EER and viviparity in amniotes. The dendrogram includes 80 species (51 extinct and 29 extant), in relation to reproduction modes, eggshell mineralization, non-EER, EER and viviparity. © Springer Nature (Jiang et al, 2023).

Curiously, fossil evidence has also shown a preference for hatchlings, through viviparity. Indeed, many species were life-bearers, including Mesozoic marine reptiles, such as ichthyosaurs and plesiosaurs. The remarkable *Ikechosaurus* evidence described above underlines the recurrent interaction between oviparity and viviparity, that is found in several groups: not only in lizards. Interestingly, the practice of EER is widespread among present-day vertebrates. That is particularly relevant among lizards and snakes.

Offsprings are released both within and without eggs. There appears to have ecological advantages to practicing EER, allowing mothers to release their young when temperatures are warm enough and food supplies are plentiful.

Concluding remarks and future prospects

The recent proposal in this topic that viviparity arose first, and then came oviparity in amniotes, is certainly provocative. That is particularly significant, taking into account the previous opposite assumption, that has been accepted for decades. The new discoveries reinforce the idea of reproductive flexibility in the animal kingdom, even at the beginning, and underscore how nature's survival strategies can be much more diverse and adaptive than previously assumed. Indeed, the complex journey of life on Earth continues to reveal surprises. On the other hand, although ontogeny does not recapitulate phylogeny in all instances, sometimes resembles it. Embryogenesis, ontogeny, phylogeny, and molecular biology will further allow to better dissect this interesting evolutionary topic. That will strengthen the recent relationships between archaeology and such disciplines. The future is certainly promising in this interesting scientific topic.

Acknowledgements. Supported by “Ministerio de Economía y Competitividad” (MINECO grant BIO2015-64737-R) and “Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria” (MINECO and INIA RF2012-00002-C02-02); “Consejería de Agricultura y Pesca” (041/C/2007, 75/C/2009 and 56/C/2010), “Consejería de Economía, Innovación y Ciencia” (P11-AGR-7322) and “Grupo PAI” (AGR-248) of “Junta de Andalucía”; and “Universidad de Córdoba” (“Ayuda a Grupos”), Spain.

References

- Dorado G, Gálvez S, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2021a): Analyzing modern biomolecules: the revolution of nucleic-acid sequencing – Review. *Biomolecules* (section Molecular Genetics) 11: 1111 (18 pp).
- Dorado G, Jiménez I, Rey I, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2013): Genomics and proteomics in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 7: 47-63.
- Dorado G, Luque F, Esteban FJ, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2021b): Molecular biology to infer phenotypes of forensic and ancient remains in bioarchaeology – Review. *Archaeobios* 15: 49-64.

- Dorado G, Luque F, Esteban FJ, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2022): Involvement of nucleic-acid methylation on biology and evolution: from first hominids to modern humans – Review. *Archaeobios* 17: 104-116.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2015): Second-generation nucleic-acid sequencing and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 9: 216-230.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Martín J, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2016): Sequencing ancient RNA in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 10: 103-111.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF (2017): Clustered Regularly-Interspaced Short-Palindromic Repeats (CRISPR) in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 11: 179-188.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2018): Evolution from first hominids to modern humans: philosophy, bioarchaeology and biology - Review. *Archaeobios* 12: 69-82
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2019): Bioarchaeology to bring back scents from extinct plants - Review. *Archaeobios* 13: 66-75.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2020): Implications of non-coding RNA on biology and evolution: from first hominids to modern humans - Review. *Archaeobios* 14: 107-118.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF (2009): Ancient DNA to decipher the domestication of dog - Review. *Archaeobios* 3: 127-132.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P, Vásquez VF (2010): Biological mass extinctions on planet Earth - Review. *Archaeobios* 4: 53-64.

- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2011): Ancient nucleic acids from maize - Review. *Archaeobios* 5: 21-28.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2012): Isotopes in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 6: 79-91.
- Dorado G, Sánchez-Cañete FJS, Pascual P, Jiménez I, Luque F, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2014): Starch genomics and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 8: 41-50.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P (2008): Sequencing ancient and modern genomes - Review. *Archaeobios* 2: 75-80.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Vega JL (2007): Archaeology meets Molecular Biology - Review. *Archaeobios* 1: 1-2.
- Hubrecht AA W (1910): Memoirs: the foetal membranes of the vertebrates. *Journal of Cell Science* 2: 177-188.
- Jiang B, He Y, Elsler A, Wang S, Keating JN, Song J, Kearns SL, Benton MJ (2023): Extended embryo retention and viviparity in the first amniotes. *Nature Ecology & Evolution* 7: 1131-1140.
- Laurin M, Reisz RR (1997): A new perspective on tetrapod phylogeny. In: Sumida S, Martin KLM (eds): "*Amniote Origins*". Academic Press (Cambridge, MA, USA): 9-59.
- Laurin, M (2005): Embryo retention, character optimization, and the origin of the extra-embryonic membranes of the amniotic egg. *Journal of Natural History* 39: 3151-3161.
- Lombardi J (1994): Embryo retention and the origin of the amniote condition. *Journal of Morphology* 220: 368.
- Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, McCoy JM (2000): Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403: 785-789.
- Mossman HW (1987): *Vertebrate Fetal Membranes*. Rutgers University Press (New Brunswick, NJ, USA).

Romer AS (1957): Origin of the amniote egg. *The Scientific Monthly* 85: 57-63.



Arqueología y filogenia para conocer la evolución del huevo amniótico y la viviparidad – Revisión

Gabriel Dorado¹, Fernando Luque², Francisco José Esteban³, Plácido Pascual⁴,
Inmaculada Jiménez⁵, Francisco Javier S. Sánchez-Cañete⁶, Patricia Raya⁷,
Teresa E. Rosales⁸, Víctor F. Vásquez⁹, Pilar Hernández¹⁰

¹ Autor para correspondencia, Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba (Spain), CE: <bb1dopeg@uco.es>; ² Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 395, 14071 Córdoba; ³ Servicio de Informática, Edificio Ramón y Cajal, Campus Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁴ Laboratorio Agroalimentario de Córdoba, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 14004 Córdoba; ⁵ IES Puertas del Campo, Avda. San Juan de Dios 1, 51001 Ceuta; ⁶ EE.PP. Sagrada Familia de Baena, Avda. Padre Villoslada 22, 14850 Baena (Córdoba); ⁷ Dep. Radiología y Medicina Física, Unidad de Física Médica, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁸ Laboratorio de Arqueobiología, Avda. Juan Pablo II s/n, Universidad Nacional de Trujillo, 13011 Trujillo (Perú); ⁹ Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas Arqueobios, C/. Martínez de Compañón 430-Bajo 100, Urbanización San Andrés, 13008 Trujillo (Perú); ¹⁰ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba.

Resumen

¿Qué fue primero, el huevo o la gallina? No se trata de un juego de palabras, una broma o una pregunta irrelevante. Dos hipótesis han intentado responderlo. La primera, y aceptada desde hace años, propone que el proceso evolutivo pasó de la oviparidad, a través de una fase de Retención Embrionaria (RE), a la viviparidad. En otras palabras, primero surgió el huevo más simple, que eclosionó en el pollo más complejo. Es lo que se conoce como modelo terrestre. De hecho, los peces suelen poner huevos, aunque algunos tiburones son vivíparos. Incluso algunos mamíferos vivos (extantes) son ovíparos (monotremas como los ornitorrincos y los equidnas). Pero nuevas pruebas han puesto en entredicho esta visión tradicional, proponiendo que fue al revés. Así, primero fue la gallina, que acabó poniendo el huevo. Este es el modelo de la Retención Embrionaria Extendida (REE). En el primer paso evolutivo de este escenario, los antiguos reptiles, aves y mamíferos eran vivíparos. Posteriormente, algunos de ellos desarrollaron la oviparidad. De hecho, varios descubrimientos arqueológicos y filogenéticos han demostrado que primero, durante el periodo RE, desarrollaron finas capas de tejidos (membranas extraembrionarias) para un mejor desarrollo del embrión, dando lugar a los

amniotas. Se sabe que los reptiles vivos (como cocodrilos y tortugas) y las aves muestran típicamente oviparidad sin REE. Pero curiosamente, la mayoría de los lagartos, serpientes y mamíferos presentan oviparidad con REE o viviparidad. Mientras continúa el debate, tanto la arqueología como la biología molecular contribuirán a aclarar este interesante tema.

Palabras clave: Dendrograma, embriogénesis, ontogenia, madre, feto, interacciones, antagónico, *Ikechosaurus*.

Abstract

Which came first, the chicken or the egg? That is not a pun, joking or irrelevant question. Two hypotheses have tried to answer it. The first, and accepted for years, proposes that the evolutionary process went from oviparity, through an Embryonic Retention (ER) phase, to viviparity. In other words, the simpler egg came first, which hatched into the more complex chicken. That is known as the terrestrial model. Indeed, fishes typically lay eggs, albeit some sharks are viviparous. Even some living (extant) mammals are oviparous, (monotremes like platypus and echidnas). But new evidence has challenged such traditional view, proposing that it was the other way round. Thus, first came the chicken, which eventually laid the egg. That is the Extended Embryo-Retention (EER) model. In the first evolutionary step of this scenario, ancient reptiles, birds and mammals gave birth to offspring. Subsequently, some of them developed oviparity. Indeed, several archaeological and phylogenetic discoveries have shown that first, during the ER period, thin layers of tissues (extraembryonic membranes) evolved for a better development of the embryo, given rise to the amniotes. It is known that living reptiles (like crocodiles and turtles) and birds typically show non-EER oviparity. But curiously, most lizards, snakes and mammals exhibit oviparity with EER or viviparity. While the debate continues, both archaeology and molecular biology will contribute to clarify this interesting topic.

Key words: Dendrogram, embryogenesis, ontogeny, mother, fetus, interactions, antagonistic, *Ikechosaurus*.

Introducción

Tradicionalmente, la arqueología y la biología molecular han pertenecido a áreas científicas completamente separadas. Afortunadamente, ese escenario cambió con el desarrollo de sistemas de amplificación *in vitro* y plataformas de secuenciación de ácidos nucleicos masivamente paralelas. Otras áreas que contribuyeron a ese avance fueron la metabolómica, la proteómica y la investigación con isótopos estables. Todo esto ha abierto la puerta a nuevos estudios apasionantes, que han permitido descifrar enigmas hasta ahora irresolubles. Esto se aplica no sólo a las especies extantes (actualmente vivas) sino incluso a las extintas. Así, el matrimonio entre arqueología y biología molecular se ha producido y está arrojando resultados sorprendentes, como hemos mostrado anteriormente (Dorado et al, 2007-2022).

En este escenario, existe una cuestión evolutiva de larga duración en la ciencia, que se ha resumido gráficamente en la siguiente pregunta: *¿qué fue primero, la gallina o el huevo?* No es una pregunta irrelevante, sino significativa. Cabe aclarar que este enigma se relaciona con los amniotas tempranos. Son un grupo de vertebrados que experimentan un desarrollo embrionario o fetal dentro del amnios, que es una membrana protectora (ya sea dentro de un huevo o no). En otras palabras, ¿los primeros reptiles, aves y mamíferos pusieron huevos, o dieron a luz a sus crías primero, evolucionando la capacidad de producir huevos más adelante? También es importante señalar que la palabra huevo en este contexto no significa la célula sexual femenina (óvulo; complementario del espermatozoide masculino), sino una estructura elaborada con membranas fetales complejas (también conocida como huevo amniótico). De hecho, un desarrollo tan notable contribuyó significativamente al éxito evolutivo de reptiles, aves y mamíferos. Los peces y los anfibios no son amniotas. Los tiburones suelen poner huevos, pero algunos son vivíparos. Los tiburones ballena son todavía más curiosos, ya que utilizan ambas estrategias: primero generan huevos, que se desarrollan dentro del cuerpo de la madre, y luego dan a luz a las crías.

Hay dos hipótesis que intentan responder a la pregunta sobre la gallina y el huevo. Así, el modelo terrestre convencional implica oviparidad (poner huevos con cáscara dura o blanda) sin retención embrionaria extendida (REE), que luego evolucionó hacia REE con oviparidad y, finalmente, viviparidad (dando a luz a crías vivas). Esto podría haber sido debido a la adaptación a los ambientes terrestres secos y cálidos, así como para evitar las interacciones antagónicas entre el feto y la madre durante la REE (Romer, 1957). Pero otra hipótesis, apoyada por recientes descubrimientos arqueológicos, ha cuestionado tal supuesto anterior, con la propuesta del modelo de REE con viviparidad (Hubrecht, 1910; Mossman, 1987; Lombardi, 1994; Laurin

y Reisz, 1997; Laurin, 2005; Jiang et al, 2023). En tal modelo, inicialmente todos los animales amnióticos tendían a la viviparidad. Por tanto, fue la gallina antes que el huevo (Jiang et al, 2023).

El atractivo de la ciencia es que cualquier hipótesis puede convertirse en una teoría aceptada, pero ese estatus sólo se mantiene hasta que surge una nueva hipótesis diferente, con mayor apoyo científico. Ese puede ser el caso en dilema del huevo y la gallina. En este escenario, los análisis arqueológicos y filogenéticos han permitido llegar a una conclusión sorprendente, mostrando una vez más el poder del método científico. Las dos hipótesis se resumen a continuación (Fig. 1).

Modelo terrestre: primero vino el huevo y luego la gallina

Cuando se propuso el enigma gallina/huevo, se supuso que la respuesta obvia era que primero vino el huevo y luego la gallina (Romer, 1957). De hecho, muchas especies filogenéticamente anteriores a los amniotas ponen huevos y no son vivíparas. Este modelo se vio reforzado aún más con el sorprendente hecho de que algunos mamíferos vivos conocidos como los monotremas (autóctonos de Australia y Nueva Guinea) no son vivíparos, sino que ponen huevos. Los monotremas que viven actualmente son el ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) y cuatro especies de equidnas: el occidental de pico largo (*Zaglossus bruijini*), el de pico largo de Sir David (*Z. attenboroughi*), el oriental de pico largo (*Z. bartoni*) con cuatro subespecies y el de pico corto (*Tachyglossus aculeatus*).

Por otro lado, los marsupiales (nativos de Australasia y América) son vivíparos, pero no tienen placenta. Por lo tanto, dan a luz a crías mucho menos desarrolladas que los mamíferos placentarios. Esto podría interpretarse como un paso evolutivo con respecto a los mamíferos ovíparos, pero aún no tan evolucionados como los placentarios. Resulta curioso, sorprendente, e incluso impactante, el descubrimiento de que la placenta evolucionó a partir de una infección retroviral (Mi et al, 2000).

Modelo de REE: primero vino la gallina y luego el huevo

El modelo terrestre anterior ha sido ampliamente aceptado hasta recientemente, cuando estudios arqueológicos y filogenéticos han revelado resultados sorprendentes. El registro fósil había demostrado previamente que los coristoderos eran morfológicamente diversos, incluidos reptiles parecidos a lagartos o cocodrilos, así como morfologías de cuello largo. Vivieron desde el periodo Jurásico Medio-Triásico, hasta el Mioceno [hace 168 a 20, e incluso 11,6 millones de años (Ma)]. Fueron considerados vivíparos.

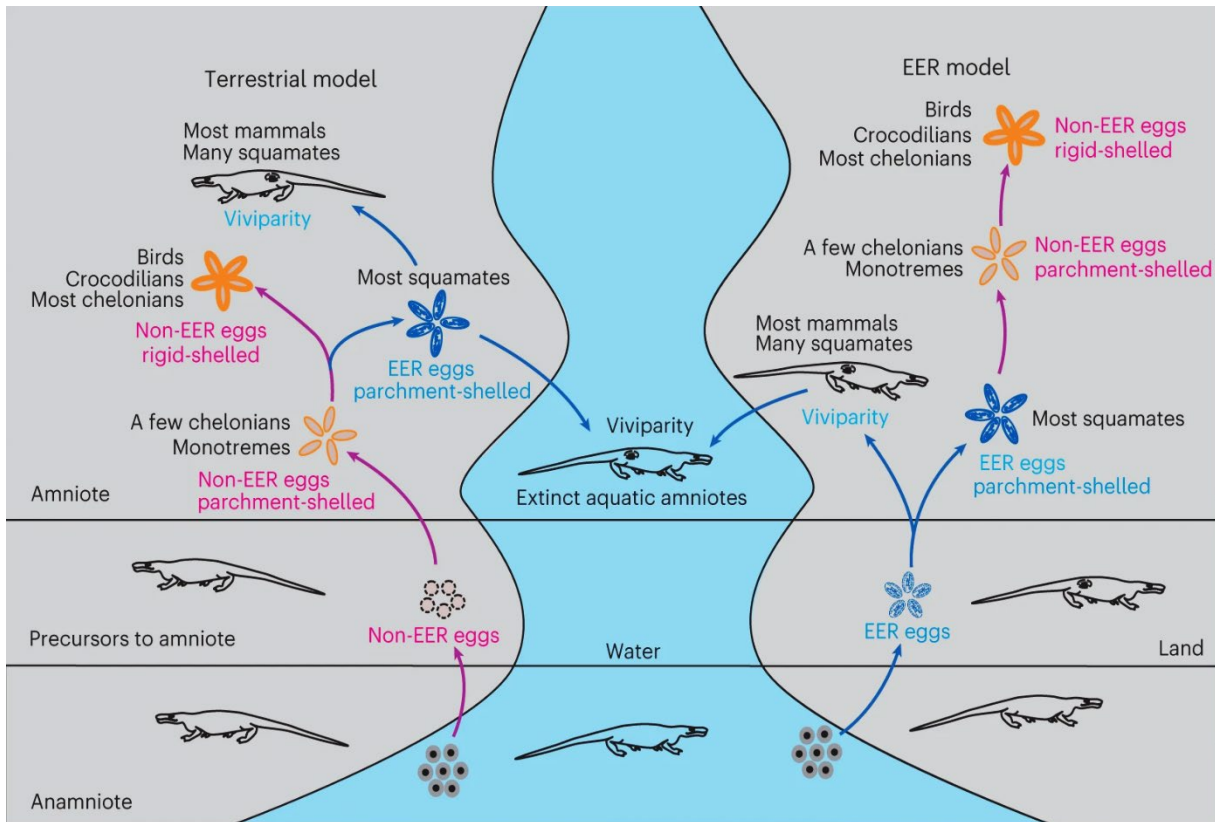


Figura 1. Dos hipótesis sobre la evolución del huevo amniótico. El modelo terrestre (izquierda) propone una oviparidad original sin REE (púrpura) y una mayor evolución hacia la oviparidad con REE y viviparidad (azul) que evoluciona varias veces. Por el contrario, el modelo de la REE (derecha) describe la evolución de la REE primitiva desde la oviparidad hasta la viviparidad (azul), con la oviparidad sin REE (púrpura) evolucionando varias veces. © Springer Nature (Jiang et al, 2023).

Sin embargo, recientemente se ha encontrado en China un espécimen de coristodero ovíparo (*Ikechosaurus* sp.) del período Cretácico Inferior (125 a 120 Ma), que sorprendentemente contiene un embrión articulado dentro de un huevo con cáscara de pergamino.

Este notable descubrimiento, junto con otras pruebas, ha sido analizado recientemente. Esto ha generado un dendrograma (árbol filogenético) de oviparidad, REE y viviparidad para amniotas existentes y extintos. Sorprendentemente, muestra que la reproducción original de los arcosauromorfos basales era con REE (incluida la viviparidad). En otras palabras, este modelo propone que las membranas extraembrionarias surgieron para controlar la interacción materno-fetal durante una REE prolongada. Así, los primeros reptiles, aves y mamíferos habrían dado a luz a sus crías y luego, algunos de ellos,

desarrollaron la capacidad de poner huevos. Curiosamente, los cocodrilos, las tortugas y las aves que viven actualmente normalmente exhiben oviparidad sin REE (ponen huevos en una etapa temprana de desarrollo), pero la mayoría de los lagartos, serpientes y mamíferos exhiben oviparidad con REE o viviparidad (Jiang et al, 2023) (Fig. 2). Incluso peces como algunos tiburones son vivíparos, aunque no son amniotas, como se ha indicado antes.

Estos hallazgos revelan signos de capacidad de retención embrionaria y viviparidad en los antepasados de todas las principales ramas evolutivas de los clados Amniota (lagartos y parientes) y Archosauria (cocodrilos, dinosaurios y aves). De esta forma, la madre retiene a las crías durante un período de tiempo variable, hasta que las condiciones sean las mejores para su supervivencia. Por lo tanto, en lugar de que el huevo de cáscara dura sea un éxito evolutivo original, esta investigación señala que en realidad fue la REE la que desencadenó el cambio.

Antes de los amniotas, los primeros tetrápodos que desarrollaron extremidades a partir de aletas de peces normalmente tenían hábitos anfibios. Vivían en el agua o cerca de ella para alimentarse y reproducirse, como los anfibios modernos incluyendo ranas, sapos y salamandras. Sin embargo, esto cambió con la llegada de los amniotas, hace 320 millones de años. Salieron del agua porque desarrollaron una piel impermeable y otras formas de controlar la pérdida de agua. Entre ellos, el huevo amniótico fue de suma importancia, convirtiéndose en un gran éxito. Era una especie de “estanque privado”, en el que se protegía al reptil en desarrollo de la desecación en climas secos y cálidos. Eso permitió al amniota alejarse de la orilla del agua, conquistar y dominar los ecosistemas terrestres.

Curiosamente, los fósiles también han mostrado una preferencia por las crías, a través de la viviparidad. De hecho, muchas especies eran portadoras de vida, incluidos los reptiles marinos mesozoicos, como los ictiosaurios y los plesiosaurios. La notable prueba fósil del *Ikechosaurus* descrita anteriormente subraya la interacción recurrente entre oviparidad y viviparidad, que se encuentra en varios grupos; no sólo en lagartos. Curiosamente, la práctica de la REE está muy extendida entre los vertebrados actuales. Esto es particularmente relevante entre los lagartos y las serpientes. Las crías se liberan tanto dentro como sin huevos. La práctica de la REE parece tener ventajas ecológicas, permitiendo a las madres liberar a sus crías cuando las temperaturas son lo suficientemente cálidas y los suministros de alimentos son abundantes.

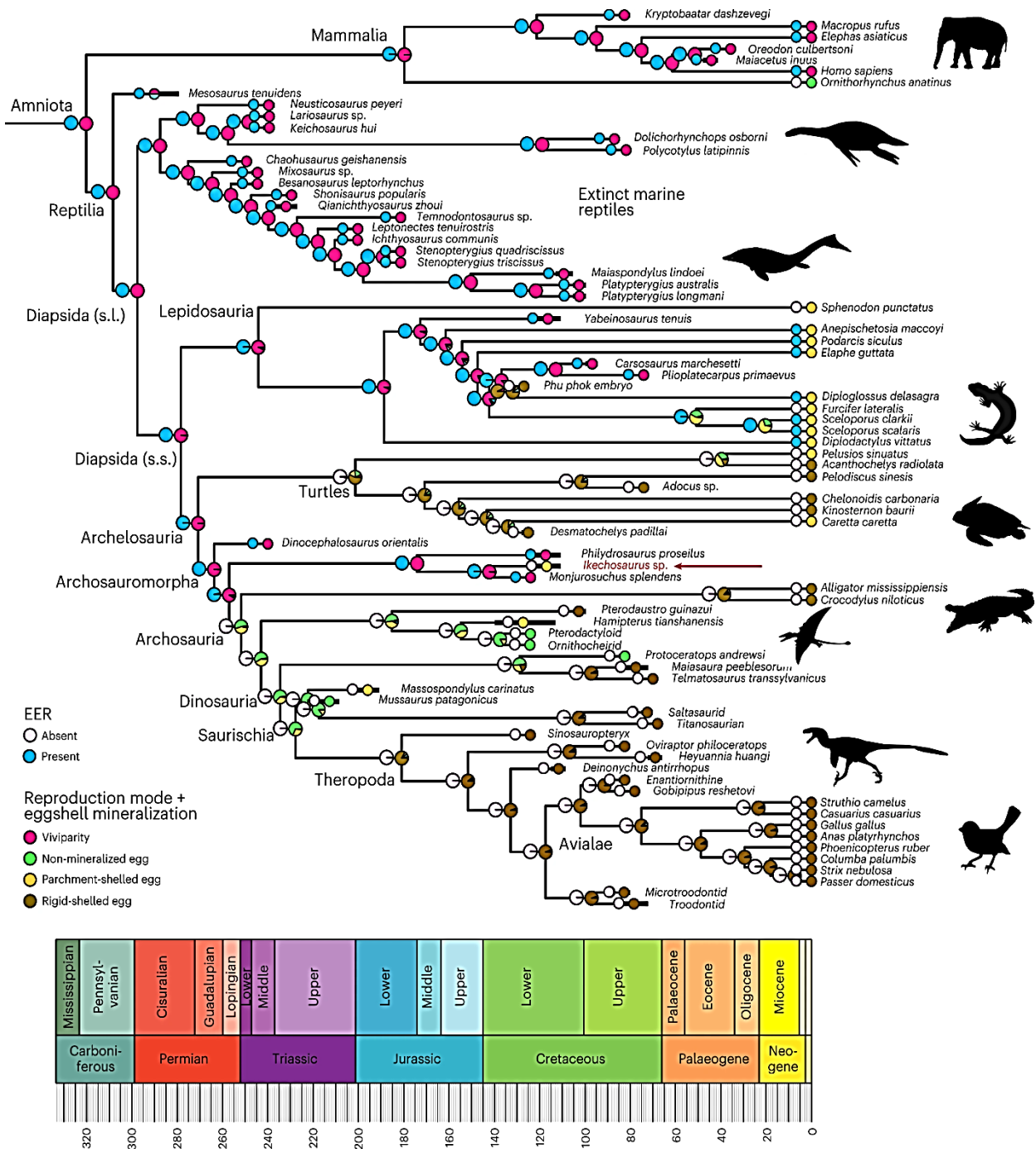


Figura 2. Filogenia de la oviparidad, REE y viviparidad en amniotas. El dendrograma incluye 80 especies (51 extintas y 29 existentes), en relación con modos de reproducción, mineralización de la cáscara de huevo, sin REE, con REE y viviparidad. © Springer Nature (Jiang et al, 2023).

Conclusiones finales y perspectivas de futuro

La reciente propuesta en este tema de que primero surgió la viviparidad y luego vino la oviparidad en los amniotas es ciertamente provocativa. Esto es particularmente significativo, teniendo en cuenta el supuesto opuesto anterior, que se ha aceptado durante décadas. Los nuevos descubrimientos refuerzan la idea de flexibilidad reproductiva en el reino animal, incluso al principio, y subrayan cómo las estrategias de supervivencia de la naturaleza pueden ser mucho más diversas y adaptativas de lo que se suponía anteriormente. De hecho, el complejo viaje de la vida en la Tierra sigue revelando sorpresas. Por otro lado, aunque la ontogenia no recapitula la filogenia en todos los casos, a veces se parece a ella. La embriogénesis, ontogenia, filogenia y biología molecular permitirán analizar mejor este interesante tema evolutivo. Esto fortalecerá las relaciones recientes entre la arqueología y dichas disciplinas. Sin duda, el futuro es prometedor en este interesante tema científico.

Agradecimientos. Financiado por Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto MINECO BIO2015-64737-R) e Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (MINECO e INIA RF2012-00002-C02-02); Consejería de Agricultura y Pesca (041/C/2007, 75/C/2009 y 56/C/2010), Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (P11-AGR-7322 y P12-AGR-0482) y Grupo PAI (AGR-248) de Junta de Andalucía; y Universidad de Córdoba (Ayuda a Grupos), Spain.

Referencias bibliográficas

- Dorado G, Gálvez S, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2021a): Analyzing modern biomolecules: the revolution of nucleic-acid sequencing – Review. *Biomolecules* (section Molecular Genetics) 11: 1111 (18 pp).
- Dorado G, Jiménez I, Rey I, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2013): Genomics and proteomics in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 7: 47-63.
- Dorado G, Luque F, Esteban FJ, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2021b): Molecular biology to infer phenotypes of forensic and ancient remains in bioarchaeology – Review. *Archaeobios* 15: 49-64.
- Dorado G, Luque F, Esteban FJ, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2022): Involvement

of nucleic-acid methylation on biology and evolution: from first hominids to modern humans – Review. *Archaeobios* 17: 104-116.

Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2015): Second-generation nucleic-acid sequencing and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 9: 216-230.

Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Martín J, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2016): Sequencing ancient RNA in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 10: 103-111.

Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF (2017): Clustered Regularly-Interspaced Short-Palindromic Repeats (CRISPR) in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 11: 179-188.

Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2018): Evolution from first hominids to modern humans: philosophy, bioarchaeology and biology - Review. *Archaeobios* 12: 69-82

Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2019): Bioarchaeology to bring back scents from extinct plants - Review. *Archaeobios* 13: 66-75.

Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2020): Implications of non-coding RNA on biology and evolution: from first hominids to modern humans - Review. *Archaeobios* 14: 107-118.

Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF (2009): Ancient DNA to decipher the domestication of dog - Review. *Archaeobios* 3: 127-132.

Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P, Vásquez VF (2010): Biological mass extinctions on planet Earth - Review. *Archaeobios* 4: 53-64.

- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2011): Ancient nucleic acids from maize - Review. *Archaeobios* 5: 21-28.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2012): Isotopes in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 6: 79-91.
- Dorado G, Sánchez-Cañete FJS, Pascual P, Jiménez I, Luque F, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2014): Starch genomics and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 8: 41-50.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P (2008): Sequencing ancient and modern genomes - Review. *Archaeobios* 2: 75-80.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Vega JL (2007): Archaeology meets Molecular Biology - Review. *Archaeobios* 1: 1-2.
- Hubrecht AA W (1910): Memoirs: the foetal membranes of the vertebrates. *Journal of Cell Science* 2: 177-188.
- Jiang B, He Y, Elsler A, Wang S, Keating JN, Song J, Kearns SL, Benton MJ (2023): Extended embryo retention and viviparity in the first amniotes. *Nature Ecology & Evolution* 7: 1131-1140.
- Laurin M, Reisz RR (1997): A new perspective on tetrapod phylogeny. In: Sumida S, Martin KLM (eds): *Amniote Origins*. Academic Press (Cambridge, MA, USA): 9-59.
- Laurin, M (2005): Embryo retention, character optimization, and the origin of the extra-embryonic membranes of the amniotic egg. *Journal of Natural History* 39: 3151-3161.
- Lombardi J (1994): Embryo retention and the origin of the amniote condition. *Journal of Morphology* 220: 368.
- Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC Jr, McCoy JM (2000): Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403: 785-789.

Mossman HW (1987): *Vertebrate Fetal Membranes*. Rutgers University Press (New Brunswick, NJ, USA).

Romer AS (1957): Origin of the amniote egg. *The Scientific Monthly* 85: 57-63.

El caballo en América: una breve crónica de su regreso

¹Claudia I. Alvarado León, ²Nicolas Delsol, ³Margarita Cossich Vielman

¹Universidad de Copenhague, Instituto de Estudios Interculturales y Regionales (ToRS),

²University of Florida, Florida Museum of Natural History, ³Posgrado en Estudios Mesoamericanos, UNAM.

Resumen

Los registros de caballos más antiguos en México datan para el Eoceno. Sin embargo, este grupo de mamíferos desaparece del territorio hacia la transición del Pleistoceno al Holoceno para regresar acompañando a los europeos en su “descubrimiento” y conquista de América a finales del siglo XV e inicios del XVI. Las impresiones en el imaginario de los habitantes de aquel territorio multicultural ante la presencia del humano sobre la bestia son manifestadas en las crónicas, en los códices y en los idiomas de cada una de estas sociedades. Este trabajo expone los primeros testimonios sobre este animal en La Hispaniola y de aquellos 16 que arribaron con la invasión española. Abordamos los medios en los que fueron representados, su significado y las evidencias de los restos óseos hallados en contextos coloniales. Nuestro objetivo, explicar la relación que establecieron los nativos con la especie animal recién llegada a sus territorios.

Palabras clave: *Equus*; Conquista Española, Imaginario, Interacción humano-fauna

Abstract

The earliest records of horses in Mexico date back to the Eocene. However, this group of mammals disappeared from the territory towards the transition from the Pleistocene to the Holocene and came back accompanying the Europeans in their "discovery" and conquest of America at the end of the 15th and the beginning of the 16th century. The impressions in the imaginary of the inhabitants of that multicultural territory regarding the presence of the human upon the beast are manifested in the chronicles, the codices, and the languages of each one of these societies. This article presents the first testimonies about this animal in Hispaniola and of those who arrived with the Spanish invasion. We address the media in which they were represented, their meaning and the evidence of bone remains found in colonial contexts. Our objective is to explain the relationship that the natives established with this animal that had recently arrived in their territories.

Key words: *Equus*, Spanish conquest; Imaginary; Human-animal interactions

Introducción

Las interacciones entre el humano y el animal varían a lo largo del tiempo obedeciendo tanto a la disponibilidad de los últimos como a las necesidades de los primeros. El resultado de estas interacciones es la presencia de patrones utilitarios que incluyen tanto su uso para alimento, vestido e instrumentos de trabajo, como su incorporación al imaginario colectivo en rituales y en aspectos religiosos (Corona-M, 2017, 2018 y 2019; Corona-M y Arroyo-Cabrales, 2002).

En este sentido, el caballo ha tenido un papel de gran relevancia para el humano desde hace cientos de miles de años, ya que éste ha sido parte de su dieta y, en muchas sociedades, de su religión; le ha servido como medio de transporte y de carga; como instrumento de guerra y de trabajo; como marcador de estatus y símbolo de prestigio; e incluso para uso deportivo.

Este trabajo tiene como objetivo ofrecer un panorama diacrónico de las travesías del género *Equus* desde sus orígenes en América, su eventual extinción del continente que le vio nacer, hasta su regreso “exitoso” derivado de la Conquista. Además, se presentan las implicaciones y consecuencias que tuvo su llegada en las sociedades mesoamericanas y la gran adaptación del animal hasta volverse indispensable en el devenir de las sociedades americanas.

Origen y domesticación: datos paleontológicos y moleculares de los caballos

Los caballos más tempranos surgieron durante el Eoceno Inferior -hace cerca de 56 millones de años- en Norte América (Priego-Vargas et al, 2016), siendo el *Hyracotherium* o *Eohippus* el más tempranamente descrito. Durante el Mioceno, la diversificación genética se acrecentó y se dio una dispersión geográfica extensa desde Norteamérica hacia Eurasia y África a través de Beringia, así como hacia Sudamérica. Hoy en día, la mayoría de esta diversidad se encuentra extinta, limitándose únicamente al género *Equus*. Muchas de las especies comenzaron a desaparecer hace cerca de 125,000 años, durante el pleistoceno y el holoceno. Sin embargo, fue hacia finales de la última era glacial, hace unos 10.000 años, que el caballo se extinguió en América. Actualmente, existe un mayor consenso de que la causa principal de la pérdida de megafauna se debió a las actividades humanas, aunque el cambio climático debió tener un papel importante (Lundgren et al, 2021: 491; Mitchell, 2017: 323).

El genoma mitocondrial del caballo se secuenció completamente por primera vez en 1994 (Xu y Arnason, 1994). Desde entonces, múltiples estudios se han centrado

en pequeñas porciones de la mitocondria, enfocándose particularmente en aclarar la historia filogenética de los caballos domésticos (Jansen et al, 2002; Lister et al, 1998; Vilà et al, 2001). Estos primeros estudios señalaron la alta variabilidad genética entre las variedades de caballos y la falta de estructuración geográfica de los diferentes haplotipos equinos. Estos estudios sugieren que, *Equus caballus* surgió luego de varios eventos de domesticación en diferentes lugares de Eurasia durante la Edad del Bronce, alrededor de 4000 años antes del presente.

Por otra parte, algunos estudios se han centrado, particularmente, en la filogeografía de las variedades de caballos entre la Península Ibérica y América (Lira et al, 2010; Luís et al, 2006; Seco-Morais et al, 2007). La comparación de la región de control en diferentes razas de caballos ibéricos y americanos reveló que los primeros eran en general los más diversos, seguidos por las poblaciones equinas sudamericanas y, por último, las norteamericanas con una diversidad genética menor (Luís et al, 2006). Entre las diferentes razas que se encuentran actualmente en el hemisferio occidental, muchas presentaron una alta frecuencia de haplotipos que se remontan a la Península Ibérica.

En lo que refiere a México, entre los mamíferos más comunes registrados para el Pleistoceno se encuentran los caballos (Jiménez-Hidalgo et al, 2019). De acuerdo con distintas investigaciones, las especies reconocidas incluyen *E. conversidens*, *E. mexicanus*, *E. francisci*, *E. ferus* y *E. cedralensis*. A la fecha, se han registrado 23 localidades en México con evidencia de caballos pleistocénicos, incluyendo los estados de México, Nuevo León, Coahuila, Aguascalientes, Puebla, Michoacán, Jalisco, San Luis Potosí, Oaxaca, Chiapas y Guanajuato (Álvarez, 1965; Jiménez-Hidalgo et al, 2019; Priego-Vargas et al, 2017).

El regreso del caballo a América

Varios milenios después de la extinción del caballo en América, los equinos arribaron a sus tierras de origen acompañando a Cristóbal Colón, el 28 de noviembre de 1493 (García, 1950: 105; Johnson, 1943). A través de una cédula, escrita por Fernando II de Aragón e Isabel I de Castilla el 23 de mayo de 1493 (Johnson, 1943), se instruía darle a Colón 20 caballos y cinco yeguas berberiscos, mismos que fueron cambiados por la propia tripulación por caballos más ordinarios (Cambero-Santano y Martín-Cuervo, 2017:121; García, 1950; Johnson, 1943: 592). Desde ese momento, el traslado de équidos al nuevo continente se dio ininterrumpidamente.

En el mapa del cartógrafo Abraham Ortelius, quien en 1570 publicó el primer atlas moderno, se localiza el golfo de Las Yeguas entre las costas al sur de la Península

Ibérica y las islas Canarias. Las Canarias eran escala obligada en los trayectos transatlánticos; de acuerdo con varios autores (Capote et al, 2002; Capote y Tejera, 2000; Fernández de Oviedo, 1851: 36), lo complicado del primer tramo de navegación de Europa a América provocaba la muerte de los equinos, mismos que tenían que ser arrojados por la borda, lo que llevó a nombrar así a dicho golfo.

A partir del segundo viaje de Colón, el archipiélago fue punto de avituallamiento para las naves en donde se proveían de varias especies de animales domésticos, entre los que se encontraban cabras, ovejas y cerdos. El archipiélago no contaba con abundancia de ganado vacuno y caballar durante los primeros viajes transatlánticos; de hecho, hacia 1531 quedó prohibida la extracción de yeguas de las Canarias en las Ordenanzas del Cabildo (Morales, 1974: 36). Por lo que, el viaje de España hacia América a través de las Macronesias y el Caribe fue el medio de difusión de estas especies en los distintos puntos de la ruta (Figura 1).



Figura 1. Mapa de la ruta intercontinental y la difusión del caballo en América durante los siglos XV y XVI. (Mapa por Nicolas Delsol).

Como acotación, cabe destacar que en uno de los viajes de Colón se enviaron tres mulas (Johnson, 1943). Estos animales, aunque menos referidos, también tuvieron un papel relevante en territorio americano. De acuerdo con García, (1950), en 1505, la nave de Alonso Núñez transportó bestias asnales desde Sevilla hacia La Española.

La isla de La Española fue la primera en sufrir el impacto de la llegada de animales de carga en 1493, poco tiempo después se extendería a otras islas antillanas (Crosby, 1972; Johnson, 1943). Mientras los pueblos arahuacos y caribes eran casi eliminados, los animales recién llegados se reprodujeron rápidamente: caballos, cerdos, reses, pollos, borregos y cabras. Los escasos depredadores americanos, las pocas o nulas enfermedades y la libertad de pastoreo en tierras ricas en pastos, raíces y frutas fueron aspectos fundamentales para la rápida reproducción de los equinos. En tan sólo una década, los habitantes de La Española podían tener una yegua para su uso personal y no pasó mucho tiempo para que se permitiera su libre comercio.

Por lo mismo, para el momento en que Hernando Cortés invadió tierra continental, los europeos ya tenían un campamento base a gran escala en el Caribe, mismo que proveyó a los conquistadores de los recursos necesarios para su empresa (Crosby, 1972). Así, Cortés enviaba continuamente emisarios a La Española para ordenar la construcción de bergantines, hacerse de mosquetes, pólvora y caballos para la guerra que estaba librando (MacNutt, 1912: 149-150).

El caballo a partir de 1519

En su obra, Bernal Díaz del Castillo (2015) destacó la llegada de los primeros 16 caballos a las costas del actual territorio mexicano en 1519. Su detallada descripción incluyó el pelaje, el temperamento, las cualidades y en algunos casos hasta sus nombres, lo que revela la importancia que tuvieron estos animales para los recién llegados. Sin embargo, únicamente 13 arribaron a Tenochtitlan el 8 de noviembre de ese mismo año. De acuerdo con Camila Townsend (2015: 98), al llegar a las costas de Veracruz, uno de los 16 caballos se quedó en el puerto y dos más murieron durante la guerra de 18 días que libraron los españoles contra los tlaxcaltecas.

Una segunda camada de 80 caballos desembarcó con Pánfilo de Narváez en 1520, quien traía la misión otorgada por el Gobernador de Cuba Diego Velázquez, de capturar a Cortés y su ejército. Años después, para el asalto final a Tenochtitlan, los españoles contarían con 86 bestias; Pedro de Alvarado llevaría cientos de equinos para la conquista de Guatemala; y, para su viaje a Las Hibueras, Honduras, Cortés partiría con 120 caballos (Cabrero, 1998; García, 1950).

En un principio, los indígenas, además de pensar que jinete y caballo eran un mismo ser (Bruhn, 1986: 10), también creían que éstos eran inmortales. Por eso, cuando un caballo moría, Cortés lo mandaba enterrar. En 1530, Francisco Pizarro hizo lo

propio para que “siempre estuviesen los indios en creencia que no podían matar los caballos” (Mira, 2016). Asimismo, los indígenas pensaban que estos animales eran devoradores de humanos y que, además, se alimentaban como humanos, por lo que les proveían de alimentos como perros, legumbres y aves.

A pesar de que las mulas y los burros no fueron tan abundantes ni solicitados en un principio como los caballos, aquellos eran utilizados por gente con rango alto como Pedro de Alvarado. Una vez que comenzaron a abundar, las mulas dejaron de ser usadas por los ricos y, años más tarde, tendrían una mayor demanda como medio de transporte en la actividad minera.

Los équidos eran la protección más preciada para los españoles, tanto por ser un excelente animal de carga y transporte, como por su eficacia como instrumento en la guerra. De acuerdo con algunos autores, los caballos funcionaban como armas psicológicas a la par de los perros (Bruhn, 1986); no obstante, su uso para impresionar a los indígenas no debió durar mucho, al percatarse de su mortalidad y vulnerabilidad en determinados terrenos. Daniel (1992) ha señalado que, el alcance del caballo como arma de guerra no se debió tanto a su impacto psicológico como a su fuerza de golpe al irrumpir en las unidades enemigas.

Entre las estrategias del ejército montado se encontraba la de enviar al frente entre tres y cinco jinetes para explorar el territorio. Otra de las tácticas implementadas en batallas, siempre y cuando el terreno fuera plano, era enviar en delantera un grupo de cinco soldados montados para romper las filas de los ejércitos mesoamericanos (Daniel, 1992: 189; Díaz, 2015: 435). Por lo mismo, para protegerlos se les confeccionaban petos de cuero o algodón (v. Bruhn, 1986: 21-24). Asimismo, era sabido que, en combates sobre terrenos accidentados como barrancos y montañas, los ballesteros tenían mejor ventaja (v. Hassig, 1992: 164).

Por otro lado, en situaciones adversas los caballos fueron utilizados como alimento para la sobrevivencia (Corona-M, 1996: 107; MacNutt, 1912: 144). Así lo constatan los relatos de Díaz (2015), Bernardino de Sahagún (2006) y el *Lienzo de Tlaxcala* (Chavero, 1892) (Figura 2), en donde se describe que, pasados seis días de la derrota de la Noche Triste, uno de los varios caballos que resultaron heridos murió, por lo que los soldados cansados y sin provisiones lo descuartizaron y comieron. Entre las consecuencias de este mismo evento, 53 españoles, varios tlaxcaltecas,

chalcas y tetzcocanos, junto con cuatro caballos fueron capturados, sacrificados y sus cabezas colocadas en el *tzompantli*¹ (Figura 3).

Distintos cronistas dejaron plasmada la idea de que, sin el caballo, los españoles no hubieran logrado la conquista de una amplia región del continente americano. Para ellos, este animal les permitió descubrir, imponerse y dominar tanto a los habitantes como al territorio.

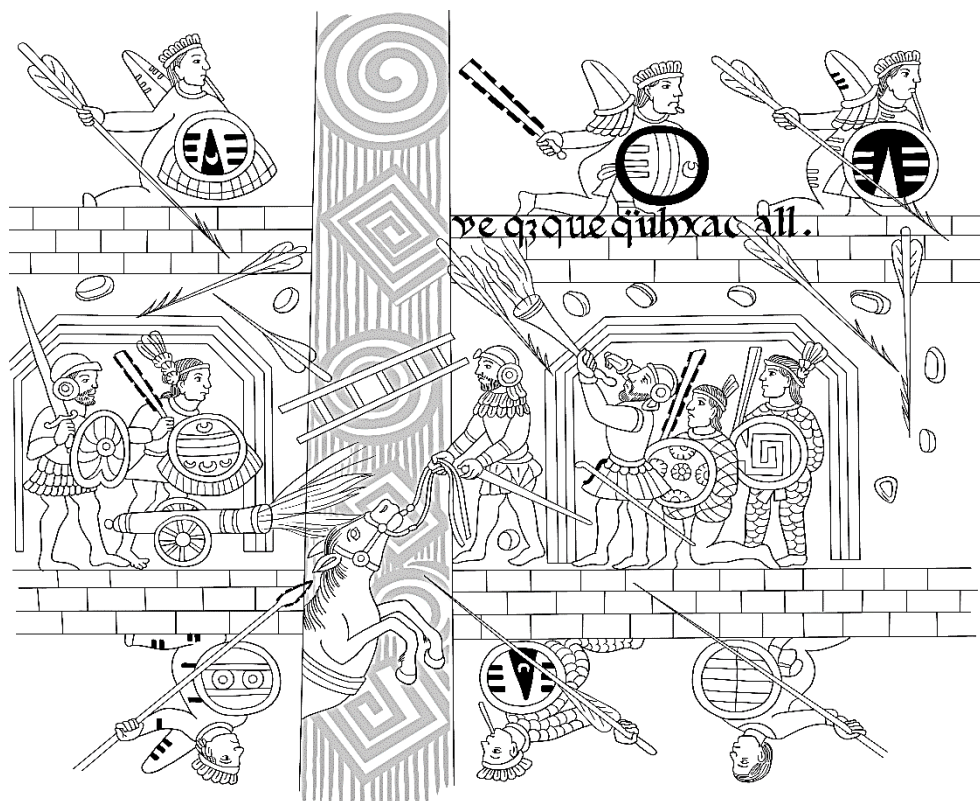


Figura 2. Representación de caballo herido en el campo de batalla. Lámina 17, *Lienzo de Tlaxcala*. «Proyecto reconstrucción histórica digital del Lienzo de Tlaxcala» Dibujo Camilo Moncada.

¹ Muro, hilera o bandera de cabezas humanas pertenecientes a individuos sacrificados o cautivos que eran exhibidos en distintas partes de la ciudad. Los cráneos eran perforados por las sienas para insertarles un palo para sostenerlos; en ocasiones las cabezas eran exhibidas con piel y cabello.



Figura 3. Tzompantli en Códice Florentino, Cap. XXXV, Libro 12.

Los caballos fueron el medio para alcanzar el objetivo final. Es probable que los nativos americanos se hayan sorprendido por la presencia de una bestia fuerte, rápida y obediente a la voz humana. Sin embargo, no tuvo que pasar mucho tiempo para que el caballo se convirtiera en un animal común; incluso, algunos dirigentes indígenas entre los tlaxcaltecas obtuvieron varios privilegios por ser conquistadores junto a los españoles. Entre ellos, se les otorgó permiso para portar armas de fuego y montar a caballo, concesión que se encontraban al mismo nivel que tener escudos de armas, estar exentos de pagar tributos, dar servicio a los pueblos y mantener sus propios gobernantes (Asselbergs, 2010; Mira, 2023: 117). También sirvieron como soborno, para disminuir los ataques de los indígenas y buscarlos como aliados.

El Lienzo de Tlaxcala

Este documento de mediados del siglo XVI es un relato realizado por los tlaxcaltecas que trata sobre la conquista de todo el territorio mesoamericano. En este documento se encuentra la mayor representación de caballos en eventos bélicos acaecidos durante la Conquista, pero también se observan recibiendo tributos de pastos y semillas. El detalle de las escenificaciones refleja tanto el ánimo de las bestias, al ser imposible no notar el enojo en sus rostros cuando se encuentran en batallas destrozando a los enemigos y sus orejas siempre hacia arriba indicando atención, como la posibilidad de distinguir si los animales caminan,

trotan, marchan o atacan (Figura 4). Es interesante notar en este mismo documento, un ejemplar siendo montado por una mujer, posiblemente la soldado española María de Estrada (Regueiro y Cossich, 2021).



Figura 4. Imagen en la que se observa a un indígena cabalgando junto con los españoles y los rasgos del ánimo y las acciones de los equinos. Lámina 18b, *Lienzo de Tlaxcala*. «Proyecto reconstrucción histórica digital del Lienzo de Tlaxcala» Dibujo Camilo Moncada.

Las tres copias del *Lienzo de Tlaxcala* y el llamado “*Fragmento de Texas*”, otro documento del siglo XVI realizado por los tlaxcaltecas para establecer su presencia en las conquistas, representan a los caballos con unas marcas al estilo de los fierros quemados en los muslos. Al respecto hay que señalar que el 16 de junio de 1529, por Ordenanza se debían registrar los hierros quemadores de ganado vacuno, ovino y caballar, apuntándolos en el libro del Cabildo dentro de los siguientes ocho días, de no hacerlo se debían pagar 20 pesos de oro de castigo (Bejarano, 1889: 239). En un estudio realizado para cotejar los fierros representados en las pictografías del *Lienzo* y documentos relacionados con las actas, no hemos encontrado una relación definitiva. Sin embargo, algunas de las correspondencias hipotéticas son los hierros de forma semejante a un número “3” reportados en 1535 para Antón Cayzedo o Miguel López y Diego Muñoz, y su identificación en los caballos representados en la conquista de Metztlán del *Lienzo de Tlaxcala*. Los hierros en forma de “X” reportados en 1534 para Cristóbal de Paredes, se asocian con las marcas de los equinos mostrados en la conquista de Zapotitlán del mismo documento; incluso, esta figura es muy parecida a la

marca que presenta el caballo de Cortés en el *Fragmento de Texas* (Figura 5). Otra posible correspondencia es que la “X” esté asociada con Juan de Sandoval.



Figura 5. Caballos con arneses decorado y marcas de hierros. Asimismo, se observan las huellas de los equinos en el camino. *Fragmento Texas*, Benson Latin American Collection, LLILAS Benson Latin American Studies and Collections, The University of Texas at Austin.

Un detalle que queda evidente en este documento es la variedad de monturas, arneses y estribos que portan los equinos. La mayoría son sencillas, variando únicamente los colores, pero existen otras muy elaboradas y elegantes. En algunos casos se observan los arneses con cascabeles pequeños alrededor de sus cuellos (Figura 5), lo que habría ayudado en las tácticas de batalla para acrecentar la presencia de estas bestias. Los pobladores seguramente quedaron tan impresionados con los sonidos que emitían estas bestias que los escribas del *Códice Florentino* representaron a uno de ellos con las conocidas volutas de la palabra saliendo de su boca.

En la reproducción del *Lienzo* por parte del tlaxcalteca Diego Muñoz Camargo a finales del siglo XVIII, encontramos en las primeras páginas las representaciones

de Cristóbal Colón, Hernán Cortés y Francisco Pizarro sobre sus caballos, así como al Rey Carlos V cuyo caballo viste una armadura, mientras que el del Rey Felipe porta una correa con detalles de querubines.

El inicio de la ganadería en el Virreinato

Después de la conquista, el caballo tuvo un papel menos espectacular, aunque no menos significativo. Además de animal de carga, fue un medio de transporte ideal. El caballo posibilitó la gran industria ganadera de la América colonial, misma que afectó grandes áreas del continente; la sociedad colonial americanoespañola fue una de las más equinas en toda la historia y esto estuvo supeditada, en gran medida, a la adaptabilidad del caballo del Viejo Mundo a las condiciones del Nuevo. Pero no fue sino hasta que la frontera española alcanzó los grandes pastizales, cuando las manadas de caballos se hicieron legendarias en la historia de América. En 1526 se dieron las primeras incursiones hacia el norte, en la región actual de San Juan del Río, Querétaro (Crosby, 1972).

Los tres grandes pastizales del imperio español fueron los llanos de Venezuela y Colombia, las praderas que van del norte de México hasta Canadá y las pampas de Argentina y Uruguay.

Para 1531, Nueva España producía menos de 200 caballos al año. Conforme los caballos fueron completando su adaptación al clima y al alimento disponible, la frontera española se movió hacia el norte hacia las planicies en donde había menos enemigos y más alimento. Alrededor de 1550, cerca de 10,000 caballos pastaban las tierras entre Querétaro y San Juan del Río. Conforme la minería fue incrementando, los europeos se fueron moviendo junto con los animales cada vez más al norte, hasta que aumentó el número de bestias alcanzando una magnitud de estampida (Crosby, 1972).

El auge minero a mediados del S. XVI requirió de la apertura de nuevos caminos para la transportación de los minerales con recuas y carretas, al momento en que tribus del norte de México se enfrentaban a los invasores (Medina, 2013). Para 1540, Querétaro ya se consideraba un bastión español contra los grupos nómadas del norte y en 1546 se establecieron las primeras estancias, con lo que se inició el auge ganadero en asociación con el descubrimiento de las minas de Zacatecas. Estos hechos se ven representados con el cambio del contenido iconográfico de las pinturas rupestres en los abrigos rocosos de Guanajuato y Coahuila, entre otros (Viramontes y Salinas, 2016).

Jesús Martínez (2015) ha señalado la posibilidad de que los caballos hayan llegado al noreste de la Nueva España antes que los propios españoles, al escaparse o ser abandonados a causa de la muerte de sus dueños. Enfrentando las adversidades de un clima distinto, así como de predadores como los lobos y los coyotes, los caballos poblaron la región ocupada por los grupos nómadas quienes, en un inicio, al asociarlos con el bisonte americano, comenzaron a cazarlos. Recientemente, un importante estudio que conjuntó datos arqueozoológicos y genéticos con tradiciones orales de comunidades indígenas de Norteamérica confirma esta interpretación (Taylor et al, 2023). Los resultados de este trabajo indican una re-domesticación de caballos cimarrones por pueblos indígenas en la región de las Grandes Planicies antes de cualquier contacto con los europeos. Este proceso de re-domesticación, que tuvo un impacto mayor en la movilidad y el estilo de vida de comunidades como los Lakotas, parece haber ocurrido a principios del siglo XVII, décadas antes de la Revuelta de los Pueblos en 1680, fecha que era tradicionalmente asociada con la entrada del caballo en esta región de Norteamérica.

Los caballos en el imaginario

Entre las primeras leyendas que refieren a equinos en América destaca la del caballo de Cortés en su viaje a Las Hibueras en 1525. Derivado de una herida que sufriría el animal, Cortés se vio obligado a dejarlo en Tayasal, Guatemala, al encargo de Canek, señor de la ciudad. Más de un siglo después, en 1697, el capitán Martín de Ursúa llegó con su caballería a Tayasal acompañado por los frailes Juan de Orbita y Bartolomé de Fuensalida. Los frailes vieron una escultura de piedra en uno de los templos, objeto que identificaron como un caballo sentado en sus partes traseras, al que los indígenas llamaban *Tzimin Chac*, dios del trueno y del relámpago. Tomando en cuenta la crónica de López de Gómara (2021), los frailes supusieron que la escultura era una representación del caballo de Cortés, leyenda que se nutrió con los textos de Díaz del Castillo (2015) así como de los de Avendaño y Loyola (2004), de López de Cogolludo (1954). Sin embargo, Escalante (2004: 49) ha señalado que pudo tratarse de la imagen de un tapir, animal sagrado para los mayas y vinculado al trueno.

En cuanto a las referencias escritas se ha de señalar que los *tlacuiloque* utilizaron libros de caballería europeos como modelos para la representación de las imágenes de caballos en lienzos, códices e incluso en pinturas conventuales (Pérez y González, 2013).

Una de las primeras representaciones gráficas que tenemos de estos animales desembarcando en la Nueva España nos la proporciona el cronista Diego Muñoz Camargo (2000), quien ilustra y describe la llegada de Cortés al puerto de Cempoala así: “*Acalli yc quitlatlati capitan*” (el barco así fue quemado por el capitán)². Al fondo de la lámina 26 de la *Descripción de la Ciudad y Provincia de Tlaxcala* aparece un navío en llamas y, en primer plano, el preciso momento en que un caballo está siendo desembarcado mediante poleas sujetadas a su centro de equilibrio (Cossich, s.f.).

Varios documentos pictóricos representan a los caballos, pero, sin lugar a duda, el que tiene una presencia mayor de equinos es el *Lienzo de Tlaxcala*. Uno de los detalles que destacan en este lienzo es el estrecho vínculo entre los españoles y estos animales transmitido por los escribas indígenas, quienes representaron en distintos lienzos de conquista, como el de *Tlaxcala* y el de *Quauhquechollan*, los caminos recorridos con huellas tanto de pies humanos como de herraduras (Figura 5).

Entre los formatos utilizados para la representación de los caballos durante la Colonia se encuentran los cuerpos rocosos del norte de México. En ellos se han reportado imágenes de caballos, algunos montados por personas con armas junto con otros elementos propios de la tradición católica como lo son las cruces y los altares (Turpin, 1990; Viramontes y Salinas, 2016). De acuerdo con dichos autores, a partir del contacto español, las figuras ecuestres fueron los primeros motivos representados en las pinturas de Guanajuato; de manera esquemática, aparecen de perfil y de forma estática en tonalidades de rojo y negro, características propias de las expresiones iconográficas de los grupos cazadores-recolectores (2016: 38). Algunas variantes en las técnicas y las características de los elementos hallados sugieren la apropiación de espacios ancestrales, así como de una expresión cultural propia de los nativos de la región (Troncoso et al, 2018; Viramontes y Salinas, 2016:42-43).

Por otra parte, en el conjunto conventual de San Miguel Arcángel de Ixmiquilpan (1550), Hidalgo, se observa un programa iconográfico que alude al conflicto entre los denominados chichimecas, representados semidesnudos y armados con arcos y flechas, con grupos sedentarios mesoamericanos que se muestran bien ataviados y armados con *macuahuitl*³. Mientras se pintaban los muros del convento, los

² Aunque las naves de Cortés fueron barrenadas, existe una descripción del texto e imagen del documento del siglo XVI escrito por Muñoz Camargo en la que una nave es quemada. (v. Thomas 1993).

³ Arma de madera larga (70-80 cm) y plana provista de navajas de obsidiana incrustadas en sus extremos laterales.

españoles enfrentaban una guerra contra los propios chichimecas al norte de la Nueva España, mismos que se resistían ante la imposición de un nuevo dogma (Pérez y González, 2013; Vergara, 2008).

También en 1550 se comenzó la construcción del Convento de San Nicolás de Tolentino, actual ciudad de Actopan, Hidalgo. Las pinturas que decoran la capilla abierta representan distintas escenas bíblicas, una de las cuales presenta a dos de los Cuatro Jinetes del Apocalipsis (Vergara, 2008). En este caso, es importante destacar la relevancia de la religión en el adoctrinamiento indígena utilizando los muros de la capilla abierta como lienzo para atemorizar con imágenes grotescas. Así, el caballo, cuya función inicial en el momento del contacto fuera la de instrumento de guerra, posteriormente se le asignaría un carácter maléfico dentro de la tradición cristiana, relacionándolos con la muerte (Curiel, 1987).

Los equinos en el contexto arqueológico

De manera general, además de las evidencias pleistocénicas de caballos, algunos restos zooarqueológicos se han encontrado de manera muy esporádica en sitios poscolombinos. Es posible que la falta de datos esté relacionada con las características y la composición de los depósitos faunísticos, así como del estatus del caballo en la sociedad colonial, pero también a la indiferencia manifiesta hacia contextos coloniales por parte de los arqueólogos y, más aún, a los restos de fauna.

Muchos de los depósitos registrados corresponden a basureros donde se descartaron desechos generados por la alimentación humana o por actividades artesanales. En la sociedad hispánica colonial, existía un fuerte tabú hacia el consumo de carne de equino (Gifford-Gonzalez y Ueno, 2007:271). Los caballos se usaban en una multitud de contextos distintos, para la tracción, el transporte, o la guerra, pero no eran considerados apropiados para el consumo humano.

El sitio de Puerto Real fue una de las primeras ciudades europeas en las Américas, fundada en el 1503 en la costa septentrional de la isla de La Española y abandonada en 1578. Este sitio ha revelado una importante colección de restos óseos asociados con las actividades humanas del puerto colonial (Deagan, 1995). Sin embargo, los restos de equinos se presentan en proporciones muy limitadas: de más de 160,000 restos faunísticos, solo 14 se pudieron identificar como pertenecientes a caballos (en comparación, se encontraron 2,121 restos de vaca). A pesar de la cantidad limitada, esta colección es de gran relevancia ya que representa unas de las evidencias materiales más antiguas del regreso del caballo a las Américas. El análisis reciente del ADN mitocondrial de uno de estos restos de caballo sugiere que, el animal colonial pertenece al haplogrupo A, una subclase del ramo equino

que se encuentra muy comúnmente en razas del Medio-Oriente al sur de Europa (Delsol et al, 2022). Este detalle parece consistente con la introducción de animales originarios de la Península Ibérica.

Por otro lado, hacia el sur de la Ciudad de México se localizan dos sitios con una ocupación que va del Posclásico Tardío hasta la Colonia: El Japón, asentamiento chinampero en el lago de Xochimilco y El Coroco, sitio en la ribera de lo que fuera el Río Churubusco (Corona-M, 1996, 2012). En el primero, se registraron 34 restos de caballo, en tanto que en el último se recuperaron 658. De acuerdo con Corona-M (1996), las evidencias apuntan a que estos animales pudieron haber sido aprovechados como alimento.

Otro hallazgo es el reportado por Jorge Angulo (1964) sobre la presencia del esqueleto de un equino asociado a los de un felino localizados en el centro de uno de los templos de planta circular en la Plaza de las Tres Culturas en Tlatelolco. Aunque el título y el tema generan expectación por su singularidad, de acuerdo con el autor, los materiales culturales utilizados para fechar los restos óseos apuntaban a un entierro “reciente”.

A manera de conclusión

A diferencia de muchas otras especies domésticas traídas por los europeos después de 1492, el caballo, o por lo menos sus antepasados, tuvo una larga historia en el continente americano. Después de su emergencia como grupo taxonómico distinto hace 56 millones de años en Norteamérica, los équidos han tenido una historia evolutiva exitosa que los llevó a colonizar amplias regiones de Eurasia. Mientras florecieron en estas regiones, donde más tarde serían domesticados por grupos humanos establecidos en la región del Mar Negro, las poblaciones de caballos desaparecieron progresivamente del hemisferio occidental al fin de las últimas glaciaciones, hace aproximadamente 10.000 años. Esta situación cambió radicalmente a finales del siglo XV, cuando los primeros europeos en llegar a las Américas trajeron de vuelta especímenes de esta familia.

La introducción de la fauna europea conllevó a profundas transformaciones para la vida, primeramente, de aquellas sociedades que habitaban el territorio mesoamericano. La dieta, la forma de transportarse, las técnicas agrícolas, el comercio y un sinnúmero de aspectos cotidianos fueron modificados.

Desde un principio, las sociedades mesoamericanas asignaron nombres en sus respectivos idiomas a los equinos, lo que reflejaba el campo semántico en el cual

colocaron a estos animales. Por ejemplo, en náhuatl se le llamó *mazatl*, mientras que en maya se le conoció como *kiej*, palabras utilizadas para denominar al venado. Un aspecto que resaltar son los limitados reportes con evidencias de caballos en sitios cuya ocupación sucedió en el momento del contacto español y en la época colonial. Por ello, es pertinente reflexionar sobre el tema y atraer la atención hacia estos contextos que, muchas veces, suelen excluirse para dar preferencia a ocupaciones anteriores. Consideramos que, además de los restos zooarqueológicos de aquellas especies que arribaron con los españoles, otros objetos como las espuelas, los arneses y hasta las armaduras que les protegían podrían recuperarse en aquellos sitios que tuvieron contacto directo con los invasores.

Referencias Bibliográficas

- Álvarez T (1965): *Catálogo Paleomastozoológico Mexicano*. INAH, México.
- Angulo J (1964): Informe sobre un esqueleto de caballo (*Equus caballus*), que se encontró en la plaza de Las Tres Culturas en Tlatelolco, D. F. *Boletín INAH* 17: 36-38.
- Asselbergs F (2010): Los conquistadores conquistados. El Lienzo de Quauhquechollan: una visión nahua de la conquista de Guatemala; Guatemala: Plumsock Mesoamerican Studies/Centro de Investigaciones Regionales de Mesoamérica. *Serie Monográfica* 18.
- Bejarano I (2018) [1889]: Actas de Cabildo de la Ciudad de México, México. Edición del Municipio Libre. *Classic Reprint Series*.
- Bruhn A (1986): Las armas de los conquistadores. Las armas de los aztecas. *Gladius* 17: 5-56.
- Cabrero L (1998): La fauna prehispánica y la ganadería colonial en la América española. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias*, Vol. 5, N° 5: 167-182.
- Camero-Santano FJ, Martín-Cuervo M (2017): El caballo de Pizarro: representaciones artísticas y realidad histórica. *XLVI Coloquios Históricos de Extremadura*: 121-145.
- Capote J, Tejera A (2000): Troncos originarios de las principales especies domésticas. Rutas migratorias y difusión de las especies. Razas destacadas.

Colonización de América Latina. Formación de razas criollas. I Curso Internacional sobre la Conservación y Utilización de las Razas de Animales Domésticos Locales en Sistemas de Explotación Tradicionales, CYTED.

Capote J, Argüello A, López J, Montedeoca M, Amills M, Tejera A (2002): Introducción de caprinos en las Islas Canarias y América: una visión desde el punto de vista etnológico e histórico. XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia: 811-818.

Chavero A [1892]: El Lienzo de Tlaxcala. *Antigüedades Mexicanas*. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.

Corona-M E (1996): 'El Japón', Xochimilco: análisis arqueozoológico de un sitio en la época de la conquista. *Arqueología* 16: 95-107.

Corona-M E (2012): Patrones faunísticos en dos sitios Post-Conquista de la Cuenca de México. *Etnobiología* 10 (2): 20-27.

Corona-M E (2017): Apuntes sobre el uso de la fauna por las culturas mesoamericanas y su carácter biocultural. *El Tlacuache* 792: 33-34.

Corona-M E (2018): Interacciones humano-fauna en Mesoamérica. *El Tlacuache* 815: 32-34.

Corona-M E (2019): Diversas facetas de las interacciones entre los humanos y los animales: algunos registros en las Américas. *Etnobiología* 17 (2): 5-10.

Corona-M E, Arroyo-Cabrales J (2002): Las relaciones hombre-fauna, una zona interdisciplinaria de estudio. *Relaciones hombre-fauna*: 17-28.

Cossich M (s.f.): Las huellas de la conquista: los primeros caballos y yeguas en la Nueva España, México. Noticonquista <http://www.noticonquista.unam.mx/amoxtli/875/875> Consultado el 20 de octubre del 2021.

Crosby A (1972): *The Columbian Exchange: Biological and Cultural Consequences of 1492*. California: Greenwood.

Curiel G (1987): Escatología y psiscomaquia en el programa ornamental de la Capilla Abierta de Tlalmanalco. Iconología y sociedad: arte colonial hispanoamericano. *XLIV Congreso Internacional de Americanistas*, México:

Instituto de Investigaciones Estéticas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Daniel D (1992): Tactical Factors in the Spanish Conquest of the Aztecs. *Anthropological Quarterly* 65 (4): 187-194.

Deagan KA (1995): *Puerto Real: the archaeology of a sixteenth-century Spanish town in Hispaniola*. Gainesville, University Press of Florida.

de Avendaño y Loyola A (2004) [1696]. Relación de las dos entradas que hice a la conversión de los gentiles itzaes y cehaches. Edición de Ernesto Vargas Pacheco. *Serie Investigadores de Mesoamérica* 5. México: UNAM /UAC.

Delsol N, Stucky B, Oswald J, Reitz E, Emery K, Guralnick R. (2022): Analysis of the earliest complete mtDNA genome of a Caribbean colonial horse (*Equus caballus*) from 16th-century, Haiti. *PLoS ONE* 17 (7): e0270600 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270600>

de Sahagún B (2006): *Historia General de las Cosas de Nueva España. Códice Florentino*, México: Ed. Porrúa.

Díaz del Castillo B (2015) [1904]: *Historia Verdadera de la Conquista de la Nueva España*. México.

Escalante P (2004): Conquistas lacustres. Tenochtitlán (1519-1521). Tayasal (1525-1696). *Arqueología Mexicana* 12 (68): 44-49.

Fernández de Oviedo G (1851): *Historia General y Natural de las Indias, Islas y Tierra-Firme del Mar Océano*. Primera Parte; Madrid: Real Academia de la Historia.

García J (1950): *Lo que España llevó a América*. Madrid.

Gifford-Gonzalez D, Ueno Sunseri K (2007): Foodways on the frontier: animal use and identity in early colonial New Mexico. *The archaeology of food and identity*. Editado por Katheryn C. Twiss, pp. 260-287; Carbondale: Carbondale Center for Archaeological Investigations, Southern Illinois University.

Hassig R (1992): *War and Society in Ancient Mesoamerica*. University of California Press

Jansen T, Forster P, Levine M, Olek K (2002): Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16): 10905-10910 <https://doi.org/10.1073/pnas.152330099>

- Jiménez-Hidalgo E, Carbot-Chanona G, Guerrero-Arenas R, Bravo-Cuevas V, Holdridge GS, Israde-Alcántara I (2019): Species Diversity and Paleoecology of Late Pleistocene Horses from Southern Mexico. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7: 394. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00394>
- Johnson JJ (1943): The Introduction of the Horse into the Western Hemisphere. *The Hispanic American Historical Review* 23 (4): 587-610.
- Lira J, Linderholm A, Olaria C, Brandstrom M, Gilbert MP, Ellegren H, Willerslev E, Lidén K, Arsuaga JL, Gotherstrom A (2010): Ancient DNA reveals traces of Iberian Neolithic and Bronze Age lineages in modern Iberian horses. *Molecular Ecology* 19 (1): 64-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04430.x>
- Lister A, Kadwell M, Kaagen LM, Jordan WC, Richards MB, Stanley HF (1998): Ancient and modern DNA in a study of horse domestication. *Ancient Biomolecules* 2: 267-280.
- López de Cogolludo D (1954): *Historia de Yucatán*. Comisión de Historia.
- López de Gómara F (2021) [1522]: *Historia de las Indias*. Madrid: Casa de Velázquez.
- Luís C, Bastos-Silveira C, Gus Cothran E, Oom M (2006): Iberian Origins of New World Horse Breeds. *Journal of Heredity* 97 (2): 107-113. <https://doi.org/10.1093/jhered/esj020>
- Lundgren EJ, Ramp D, Stromberg JC, Wu J, Nieto NC, Sluk M, Moeller KT, Wallach Ad (2021): Equids engineer desert water availability. *Science* 372: 491-495. <https://doi.org/10.1126/science.abd6775>
- MacNutt FA (1912): *De Orbe Novo. The Eight Decades of Peter Martyr D'Anghera*. Vol. 2. Nueva York: The Nickerbocker Press.
- Martínez JD (2015): El caballo y el hombre en el noreste colonial. *Bordeando el Monte*: 21: 3-8.
- Medina J (2013): *Colotlán y sus arrieros*. Arrieros de México. <https://javiermedinaloera.com/arrierosdemexico/?cat=3&paged=2> Consultado 10 de septiembre del 2021.
- Mitchell P (2017): I Rode through the Desert: Equestrian Adaptations of Indigenous Peoples in Southern Hemisphere Arid Zones. *International Journal of Historical Archaeology* 21(2):321-345. DOI:10.1007/s10761-016-0380-3.

- Mira E (2016): Caballos y la Caballería en la Conquista de América. <https://estebanmiracaballos.blogia.com/2016/011701-caballos-y-la-caballer-a-en-la-conquista-de-am-rica.php> Consultado el 13 de septiembre del 2021
- Mira E (2023): *El descubrimiento de Europa*. Barcelona: Crítica.
- Morales F (1974): *Ordenanzas del Consejo de Gran Canarias (1531)*. Gran Canaria: Ediciones del Excelentísimo Cabildo Insular de Gran Canaria.
- Muñoz Camargo D (2000): *Descripción de la ciudad y provincia de Tlaxcala*. Biblioteca Tlaxcalteca, El Colegio de San Luis.
- Pérez JL, González S (2013): Los murales del Convento de Ixmiquilpan, México, y la imagen de la guerra occidental. *Colonial Latin American Review* 22 (1): 126-147. <https://dx.doi.org/10.1080/10609164.2013.769334>
- Priego-Vargas J, Bravo-Cuevas VM, Jiménez-Hidalgo E (2016): The Record of Cenozoic Horses in Mexico: Current Knowledge and Palaeobiological Implications. *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments* 96 (2): 305-31. <https://DOI:10.1007/s12549-015-0223-y>
- Priego-Vargas J, Bravo-Cuevas V, Jiménez-Hidalgo E (2017): Revisión taxonómica de los équidos del Pleistoceno de México con base en la morfología dental. *Revista Brasileira de Paleontología* 20 (2): 239-268. <https://DOI:10.4072/rbp.2017.2.07>
- Regueiro P, Cossich M (2021): La participación de las mujeres indígenas y españolas en la Conquista. *Conquistas: actores, escenarios y reflexiones Nueva España (1519-1550)*, editado por Martín Ríos Saloma, pp. 259-292; Madrid: Silex- Ultramar.
- Seco-Morais J, Oom MM, Quesada F, Matheson CD (2007): Ancient Iberian horses: a method to recover DNA from archaeological samples buried under sub-optimal conditions for preservation. *Journal of Archaeological Science* 34 (10): 1713–1719 <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.12.009>
- Taylor WTT, Librado P, Tasunke MH, et al. (2023): Early dispersal of domestic horses into the Great Plains and northern Rockies. *Science* 379 (6639): 1316–1323. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.adc9691>
- Thomas H (1993): *La conquista de México*. Barcelona: Editorial Planeta.

- Townsend C (2015): *Malintzin: Una mujer indígena en la Conquista de México*. México: Ed. ERA.
- Troncoso A, Armstrong F, Basile M (2018): Rock Art in Central and South America: Social Settings and Regional Diversity. *The Oxford Handbook of the Archaeology and Anthropology of Rock Art*, <https://DOI:10.1093/oxfordhb/9780190607357.013.53>
- Turpin S (1990): Rock Art and Hunter-Gatherer Archaeology: A Case Study from SW Texas and Northern Mexico. *Journal of Field Archaeology* 17 (3) 263–281 <https://DOI:10.1179/009346990791548259>
- Vergara A (2008): *El infierno en la pintura mural agustina del Siglo XVI*. Actopan y Xoxoteco en el estado de Hidalgo; Pachuca: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Vilà C, Leonard JA, Götherstrom A, Marklund S, Sandberg K, Liden K, Wayne RK, Ellegren H (2001): Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* 291 (5503): 474-477 [https:// DOI: 10.1126/science.291.5503.474](https://DOI:10.1126/science.291.5503.474)
- Viramontes C, Salinas F (2016): Cruces, Altares y Glosas. El Avance Evangelizador en el Arte Rupestre de Guanajuato. *Arqueología* 51: 31-51.
- Xu X, Arnason U (1994): The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* 148 (2): 357-362 [https://DOI:10.1016/0378-1119\(94\)90713-7](https://DOI:10.1016/0378-1119(94)90713-7)



El “caracol terrestre” *Scutalus spp.* en la iconografía mochica: El símbolo de la espiral y el ciclo del agua

¹César Gálvez Mora y ²María Andrea Runcio

¹Academia Nacional de la Historia (Lima, Perú) e Instituto de Estudios Andinos (Berkeley, EE. UU.). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8751-6266>, Email: arkeologo@yahoo.com;

²Centro de Investigaciones Precolombinas (Buenos Aires, Argentina). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3756-884X>, Email: andrearuncio@hotmail.com

Resumen

A partir de la información etnográfica, ambiental e iconográfica, vinculada al “caracol terrestre” *Scutalus spp.*, se aborda el contexto ritual de carácter funerario al cual se asocian las representaciones de este molusco en la cerámica mochica: tanto las escenas de recolección, de combate y del sacrificio de la montaña, como los diseños de caracoles, animales híbridos, entre otros. Las representaciones de caracoles pueden ser ubicadas en los solsticios de verano e invierno, así como -excepcionalmente- cuando ocurre El Niño/Oscilación del Sur. El molusco puede ser considerado como metáfora del agua y de regeneración, y su morfología desarrolla el símbolo del espiral en tres dimensiones, replicado en modelos arquitectónicos con rampa en espiral, así como en el caso excepcional de un pozo ceremonial mochica.

Palabras claves: caracol terrestre, El Niño/Oscilación del Sur, iconografía, Mochica, agua, lomas

Abstract

Based on ethnographic, environmental and iconographic information, linked to the “land snail” *Scutalus spp.*, the ritual context of a funerary nature is addressed, to which the representations of this mollusk in Mochica ceramics are associated: both the collection scenes, combat and mountain sacrifice, as the designs of snails, hybrid animals, among others. Representations of snails can be located on the summer and winter solstices, as well as -exceptionally- when El Niño/Southern Oscillation occurs. The mollusk can be considered a metaphor for water and regeneration, and its morphology develops the symbol of the spiral in three dimensions, replicated in architectural models with a spiral ramp, as well as in the exceptional case of a Mochica ceremonial well.

Key words: Land snail, El Niño/Southern Oscillation, iconography, Mochica, water, fog vegetation.

Introducción

El “caracol terrestre” *Scutalus spp.* (Figs. 1, 2) es un gasterópodo de la familia Bulimulidae, que se distribuye en la vertiente occidental de la Cordillera de los Andes (Ramírez et al, 2009); en particular en los departamentos de Lima, Ancash, La Libertad y Cajamarca, en altitudes que varían de 50 a 1850 (-2700) msnm (Breure, 1979: 83). Usualmente vive en los cerros, adherido a las rocas y a ciertos vegetales, y se multiplica en los períodos de mayor humedad, en condiciones normales.

Los restos de *Scutalus spp.* se presentan desde épocas muy tempranas en sitios paijanenses (ca. 13.000 a.P.) (Chauchat et al, 1998; Gálvez, 1992), en tanto su representación adquiere gran notoriedad en la iconografía de la cerámica funeraria mochica (de Bock, 1988, 2000, 2012; Donnan, 1985; Giersz y Przadka-Giersz, 2008; Golte, 1985; Hocquenghem, 1987; Jia, 2019; Jiménez, 1985; Kutscher 1977; Larco, 1966, 2000; Lau, 2022; Quilter, 2010; Uceda et al, 2016; Wiersema, 2012, 2016; Zevallos, 1985), lo cual significa que los caracoles terrestres poseen un simbolismo importante en el contexto mortuario. También la iconografía representa la recolección de estos moluscos, tanto en forma manual como utilizando un palo (Donnan, 1985; Golte, 1985; Hocquenghem, 1987; Kutscher, 1977; Larco, 1966). En estos casos, no se trata de una documentación de la vida cotidiana, sino de una actividad relacionada con un aspecto del ritual funerario.

Por otra parte, en la actualidad la información etnográfica (Gálvez et al, 1993) ha permitido registrar la abundante presencia de caracoles en tres situaciones que tienen en común la presencia de agua: el reverdecimiento de las lomas en invierno, las lluvias estacionales del verano y El Niño/Oscilación del Sur (ENOS).

En este artículo procuramos interpretar el contexto ritual y el significado simbólico de los caracoles comestibles así como su característica caparazón en espiral. En este propósito, nos apoyaremos en la información ambiental, etnográfica y en las representaciones de la iconografía mochica donde aparecen caracoles terrestres.

El caracol y el agua

La mayor abundancia de caracol terrestre se presenta en tres escenarios, en los cuales se reproduce y está activo: invierno (lomas), verano (lluvias estacionales) y la ocurrencia de ENOS. La recolección manual de estos moluscos consiste en presionar el apex de abajo hacia arriba, con el dedo pulgar, para despegarlos y

luego depositarlos en una bolsa o alforja (Gálvez et al, 1993). La recolección con palo se realiza cuando los caracoles están fuera del alcance del recolector.



Figura 1. "caracol terrestre" *Scutalus spp.*

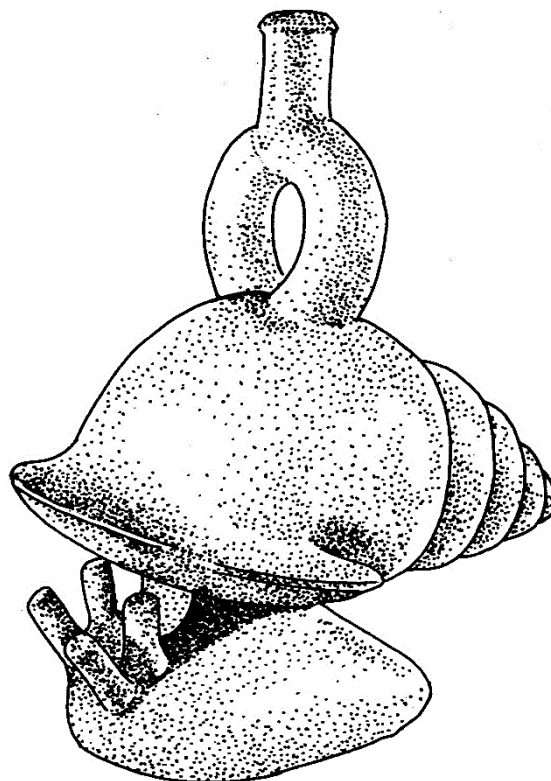


Figura 2. Botella mochica (Fase I) que representa un caracol terrestre.

El reverdecimiento de las lomas en invierno

De acuerdo con el dato etnográfico (Gálvez, 1993) (Fig. 3), se tiene los siguientes casos:

- Las lomas del cerro Campana (valles de Moche y Chicama) (Fig. 4); hacia donde iba un recolector de Santiago de Cao, entre enero y marzo, y entre abril y mayo de 1931.
- Las lomas del cerro Ochiputur y las inmediaciones del cerro Grande o cerro La Mina, en especial el sector “El Alfalfarillo” (valle de Moche); donde antaño los recolectores de la villa de Moche realizaban su faena entre abril y diciembre y, con mayor énfasis, entre junio y julio, cuando la vegetación lomal era abundante (Gálvez et al, 1993).
- Cerros Las Lomas (valle de Virú), que eran visitados por los recolectores de Virú en la época invernal.

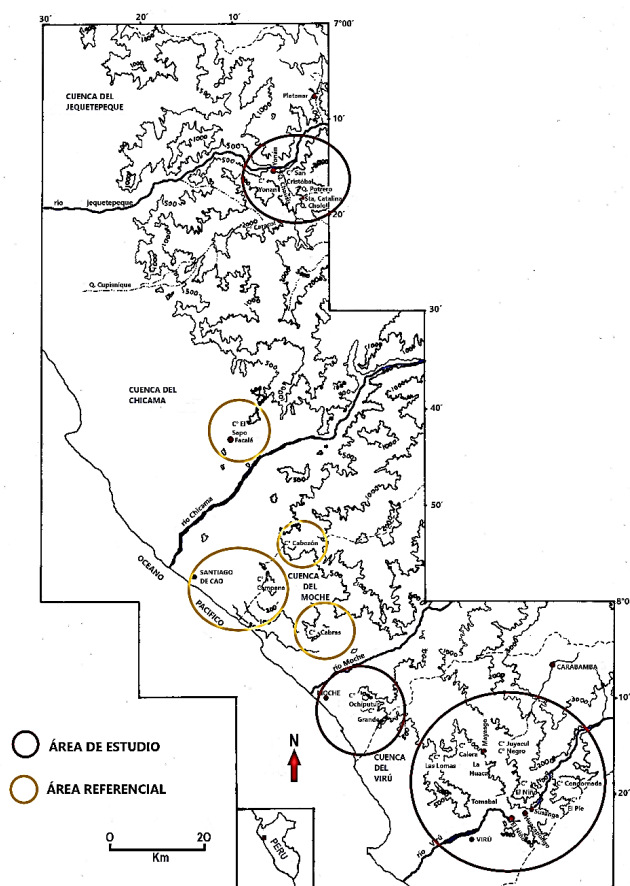


Figura 3. Zonas de recolección de caracol terrestre en los valles de Jequetepeque, Chicama, Moche y Virú, de acuerdo con el dato etnográfico.



Figura 4. Vegetación lomal en el cerro Campana, valles de Moche y Chicama.

Las lluvias estacionales del verano

Conforme a la información etnográfica (Gálvez et al, 1993) (Fig. 3) se tiene a varios lugares:

- a. La quebrada Chausís, a unos 4 km de distancia de la localidad de Yonán (valle medio del Jequetepeque), donde se realizaba la recolección manual de caracol terrestre en el verano, por encima de los 500 msnm. Ahí, una densa vegetación incluía al “hualtaco” *Loxopterigium huasango* y el “gigantón” *Neoraimondia arequipensis*, a los cuales se adherían las colonias de caracoles (Fig. 5).
- b. A más de 10 km al noreste de la localidad de Virú (valle de Virú), y hasta en lugares con altitudes cercanas a los 3000 msnm, donde las precipitaciones pluviales favorecían la abundancia de estos moluscos aparejada al incremento de la flora. En estos sitios se recolectaba el caracol terrestre a mano.

El Niño/Oscilación del Sur (ENOS)

Según el dato etnográfico (Gálvez et al, 1993) (Fig. 3), se tiene la mención a tres lugares de recolección:

- a. El cerro El Sapo, a 2 km al noreste de la antigua hacienda Facalá (valle de Chicama), de donde provenían los caracoles terrestres que se consumían en esa localidad en 1925 -año en el que ocurrió ENOS- los cuales fueron recolectados manualmente en el verano, aunque también en otras épocas de ese año.
- b. Las lomas del cerro Cabezón (valle de Moche) (Fig. 6), en donde al ocurrir ENOS de 1982-1983 se registró la presencia de hasta 100 caracoles por decímetro cuadrado (Eloy López, comunicación personal, enero de 1988).
- c. Las lomas del cerro Cabras (valle de Moche), sitio de recolección manual de caracoles terrestres para fines alimenticios, cuando ocurrió ENOS de 1925 (Alfredo Gómez, comunicación personal, febrero de 1988).



Figura 5. Recolección de caracoles terrestres en la quebrada Chausís, valle de Jequetepeque.



Figura 6. Vegetación lomal en el cerro Cabezón, valle de Moche.

Además de los datos anteriores, también existe información acerca de la recolección de caracol terrestre en invierno, en el valle de Moche (Gillin, 1947: 26) y de la presencia de este molusco en las cercanías de la localidad de Laredo, donde los lugareños ya no lo utilizaban pese a ser comestibles (Pozorski, 1976: 216, 217). Además hay versiones de su aparición en la primavera, y de que su recolección y consumo sería una costumbre antigua en la costa norte (Kutscher, 1977: 19). También se cuenta con referencias a la recolección de caracol terrestre cuando reverdecían las lomas, a partir de mayo y junio, en varios cerros del valle de Moche (Jiménez, 1985: 33); y, finalmente sobre la recolección de estos moluscos en las lomas de Virú con mención a su venta en el mercado de esa localidad (Netherly, 1977: 72).

La información etnográfica antes mencionada cuestiona la vinculación de escenas, denominadas “el ‘combate’ de la estación seca” y “el ‘sacrificio’ de la estación seca”, solo con las formaciones lomaes (invierno) (Hocquenghem, 1987: 179, 183; figs. 178, 186; Golte, 1985: 357). Es más, la flora representada en estas escenas, v. g. la “achupalla” *Tillandsia sp.* es común a otras zonas de vida (Mostacero et al, 2007:

156-160) donde también aparece *Scutalus*, y que se asocian a las lluvias del verano y, excepcionalmente, a ENOS.

El caracol y las evidencias arqueológicas

Las más tempranas evidencias arqueológicas de *Scutalus spp.* corresponden al Paijanense (ca. 13.000 a.P.) (Chauchat et al, 1998; Gálvez, 1992) y también se le ha identificado en el registro de épocas posteriores, desde el Precerámico Final (ca. 2.500 a.C.) hasta el Horizonte Tardío (ca 1.470/75 d.C.) (Pozorski, 1976: tablas 5, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 48, 50, 52, 54; Vásquez y Rosales, 2008: p. 72; 2012: 293, 298, 299 300; 2016: 264, 267, 268, 269, 270).

A ello se suma su representación en la cerámica mochica (de Bock, 1988: fig. 120; 2000: fig. 27; Donnan, 1985: 53, 66, 67; Giersz y Przada-Giersz, 2008: fig. 1; Golte, 1985: 357, fig. 2; Hocquenghem, 1987: figs. 178, 181, 186; Jia, 2019: fig. 70; Jiménez, 1985: 24; Kutscher, 1977: fig. 19; Larco, 1966: fig. 14; 2000: fig. 409; Lau, 2022: fig. 2.22; Quilter, 2010: 15; Uceda et al, 2016: 152; Wiersema, 2012; 2016: 71, fig. 76; Zevallos, 1985: 112, 165).

En base al dato etnográfico, podemos inferir que las escenas de recolección de caracoles terrestres en la iconografía mochica (Larco, 1966: fig. 14; Golte, 1985: 357, fig. 2; Donnan, 1985: 53, 66, 67; Kutscher, 1977: fig. 19), tuvieron como hecho común la presencia de agua (neblina, en el caso de las lomas; lluvias de verano en el valle medio, o lluvias torrenciales generadas por ENOS).

Adicionalmente, en la iconografía mochica la recolección de caracoles terrestres es realizada por personajes de distintas clases sociales (Donnan, 1985: 53, 66, 67), como es el caso de: sacerdotes/guerreros, sacerdotes, pescadores/cazadores de lobos marinos¹. Corresponde subrayar que todo ello no es una actividad cotidiana, como tampoco lo son todo un conjunto de diversas actividades “no seculares” mochicas (Donnan, 1985: 80, 82, 84, 86, 88, 90).

En una escena (Fig. 7), aparecen sacerdotes de rangos diferentes que, provistos de una bolsa, recolectan caracoles terrestres con un palo y con la mano, en un paisaje donde se advierte un zorro y flora característica del Piso Altitudinal Inferior de vegetación (Mostacero et al, 2007: 144-146), como arbustos (¿“palo verde” *Cercidium praecox?*), “achupalla” *Tillandsia sp.*, y “gigantón” *Neoraimondia*

¹ En Hocquenghem (1987, figs. 120 y 121), los cazadores de lobos marinos también llevan un tocado simple, rematado en dos apéndices en la parte delantera, como el que usan los pescadores.

arequipensis. Todos los caracoles están en actividad porque muestran sus tentáculos oculares, como indicador de un ambiente húmedo. En cuanto al zorro, es importante indicar que "...cumple, simultáneamente, la función de medidor entre el mundo de arriba y el mundo de abajo" (Espino, 2014: pp. 32), y "... es un *zooindicador* de lo que puede ocurrir en el año en términos de producción" (Op. Cit.: 24); acerca del cual nos ocuparemos más adelante.



Figura 7. Escena de recolección de caracoles terrestres por sacerdotes (dibujo de Donna McClelland. Moche Archive, Dumbarton Oaks, Trustees for Harvard University, Washington, D.C.).

También, pescadores de diferentes clases sociales, caracterizados por su vestimenta a rayas y un bulto amarrado a la cintura, coinciden en una escena de recolección de caracoles terrestres utilizando un palo (Fig. 8). En ésta se advierte que los caracoles muestran sus tentáculos oculares, y en el paisaje se advierte la "tuna silvestre" *Opuntia sp.* y el "gigantón" *Neoraimondia arequipensis*, típicos del Piso Altitudinal Inferior de vegetación (Espino, 2014: 144-146),

De otro lado, el encuentro entre distintas clases sociales es evidente en una escena donde convergen pescadores y sacerdotes/guerreros que se distinguen por su vestimenta con el motivo de doble escalera (Fig. 9), vinculado con las montañas, y que es similar al que aparece en la indumentaria del Dios de la Montaña (de Bock, 2012: figs. 91, 92, 96, 97, 98, 106, 107, 108) y de los guerreros de alto rango (de Bock, 2012: figs. 44a, 44b, 44c). Todos los personajes usan un palo para recolectar los caracoles terrestres que muestran sus tentáculos oculares. En el paisaje aparecen el "gigantón" *Neoraimondia arequipensis* y "cola de zorro" *Haageocereus sp.*

En términos generales, todas estas escenas son realizadas en épocas de mayor humedad, que es cuando abundan y se reproducen los caracoles terrestres. Por

otra parte, destacamos que el caracol suele ocultarse en el día, para lo cual busca un lugar bajo sombra para adherirse a fin de evitar la luz directa del sol.

En nuestra opinión, la conducta del caracol terrestre lo convierte en un símbolo de regeneración, por cuanto alterna la salida de su caparazón (“vida”), con su ocultamiento (“muerte”) cada vez que cesan las condiciones de mayor humedad. También tiene un poderoso vínculo con el agua (neblina, lluvia), dado que lo “captura” y lo contiene; por tanto, es símbolo de agua. Además, es probable que su recolección en invierno (lomas) y en verano (lluvias) haya tenido connotaciones diferentes en cada caso; y otras cuando acontecía ENOS.



Figura 8. Recolección de caracoles terrestres por pescadores de diferente rango (dibujo de Donna McClelland. Moche Archive, Dumbarton Oaks, Trustees for Harvard University, Washington, D.C.).



Figura 9. Escena de recolección de caracoles terrestres por pescadores y sacerdotes/guerreros (dibujo de Donna McClelland. Moche Archive, Dumbarton Oaks, Trustees for Harvard University, Washington, D.C.).

Es posible que su recolección tuviera como fin el apropiamiento simbólico del agua representada por el caracol y el control del ciclo del agua; y tal vez su dedicación en comidas rituales. De otro lado, su representación en la iconografía de la cerámica que acompañaba a los muertos, debió tener como motivación simbólica la regeneración y la intercesión del difunto para propiciar la venida del agua y controlar los eventos pluviales.

El espiral y el caracol terrestre

El espiral en la iconografía

El espiral forma parte del símbolo de “la escalera y la ola” que es considerado “...como una representación abstracta de una montaña (el triángulo escalonado) y un río (la ola) corriendo por su ladera” (de Bock, 2003: 312-313); asimismo, “...su simbolismo expresó el ciclo anual de regeneración en la naturaleza, documentado por la relación con montañas, ríos, sangre y por último con el solsticio de diciembre” (de Bock, 2003: 321); y ha sido representado por los mochicas en la pintura mural (Mujica, 2007: 14, 125, 128, 208; Uceda et al, 2016: 186, 187) (Fig. 10), en la cerámica (de Bock, 1988: figs. 182, 214, 215, 216, 217, 218; 2000: figs. 1, 41; 2012: p. 143, fig. 61c; Heck, 2015: fig. 69; Hocquenghem, 1987: figs. 28, 69, 189,190; Lavalle, 1985: 128; Mujica, 2007: 18, 204; Ubbelohde-Doering, 1983: lám. 24: 2, 3; Uceda et al, 2016: 175) (Fig. 11); en mate pirograbado (Vergara, 2015: lám. 8), en ornamentos metálicos (Lavalle, 1985: 217; Pillsbury et al, 2017: fig. 24) y en tejidos (Lavalle, 1985: 238, 239).



Figura 10. Símbolo de la escalera y la ola en un recinto esquinero temprano de la Huaca Cao Viejo, El Brujo, valle de Chicama.



Figura 11. Símbolo de la escalera y la ola en la base de una botella mochica (fase II).

Además, en la cerámica Lambayeque (Jia, 2019: fig. 104), así como en el arte plumario (King, 2012: figs. 30, 32), en mate pirograbado (Vergara, 2015: láms. 24, 31) y arquitectura de la misma época, *v. gr.* un ambiente arquitectónico ubicado al sur de la Huaca Chornancap, cuya planta replica “la escalera y la ola” (Wester,

2016: figs. 63, 66, 67, 82, 83; 2018: figs. 63, 64, 65, 66; Gálvez, 2017). Y, en la época Chimú, en los muros de templetos del conjunto Nik An (antes Tschudi) en Chan Chan (Gálvez y Runcio, 2010: figs. 11, 14) así como en mates pirograbados (Vergara, 2015: láms. 34, 73).

Corresponde subrayar la asociación de las montañas con la fertilidad, la lluvia y la idea de contenedores de agua; así como su condición de entidades dominantes de las fuerzas naturales (Topic, 1992: 41-42, 93; Vitry, 2007: 70). Además, a fines del siglo XVI, Albornoz (citado en Reinhard, 1987, p. 31) destacaba entre las huacas principales a las montañas ubicadas entre el sur del Perú y la parte central del Ecuador. Deidades como el Coropuna (sur), Pariacaca (oeste)², Ausangate (suroeste)³ y Catequil (norte)⁴, controlaban los fenómenos meteorológicos (Reinhard, 1987). De la misma manera, la adoración y/o entrega de ofrendas a las montañas en el poblado de Socaire (Chile), al Illimani (Bolivia) y al antes mencionado Ausangate (Cusco), se basa en la creencia de que estas pueden enviar agua para las siembras y el ganado (Reinhard, 1992: 91-92, 95).⁵ Es decir, la montaña y el agua son mutuamente complementarios.

El espiral, entendido como "... un motivo abstracto de las montañas y los ríos" (de Bock, 2003: 313), ha sido representado como indicador de humedad en la nariz de animales como el jaguar, en el caparazón de los caracoles terrestres, y en el cuello de la garza (de Bock, 2012: 143; figs. 61d, 61e, 61f). Es también un símbolo recurrente en los sitios rupestres (Gálvez et al, 2012; fig. 5) (Fig. 12), así como en otros objetos de diversa naturaleza y cronología (de Bock, 2000: figs. 8, 25; 2012: fig. 61; Heck, 2015: fig. 45; Hocquenghem, 1987: figs. 57, 69, 83, 86, 87, 93, 94, 96; Lavalle, 1985: 165, 185, 186; Vergara, 2015: láms. 31; 104, 107, 121, 125; Wester, 2018: figs. 27, 28, 29) (Fig. 13). Asimismo, es importante subrayar que el aspecto de la fertilidad se refleja en otras representaciones, como es el caso de los corredores que ascienden describiendo un recorrido en espiral, quienes llevan en una de sus manos una pequeña bolsa con pallares (Fig. 14).

² Entre los departamentos de Lima y Junín (Fig. 10).

³ Dpto. de Cusco (Fig. 10).

⁴ Dpto. de La Libertad (Fig. 10).

⁵ Caso similar a lo documentado en el Cañón del Colca (Reinhard, 1996, p. 70).



Figura 12. Símbolo espiral en un geoglifo de la Quebrada de La Mónica, valle de Chicama.



Figura 13. Símbolo espiral en una botella mochica (fase III) (Fuente: Museo Larco).

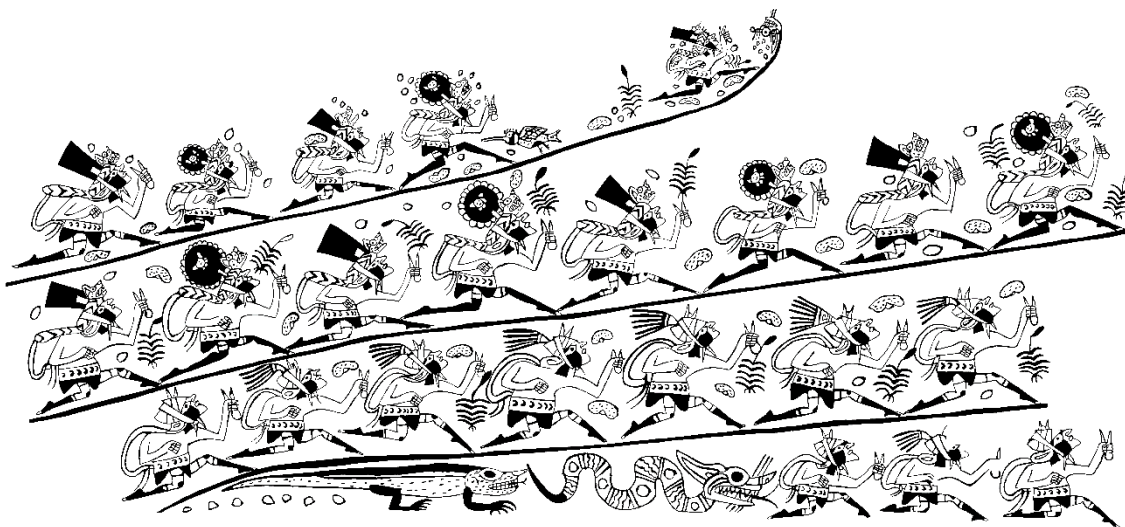


Figura 14. Corredores mochicas ascendiendo en espiral (dibujo de Donna McClelland. Moche Archive, Dumbarton Oaks, Trustees for Harvard University, Washington, D.C.)

El espiral tridimensional

En nuestra opinión, el caparazón del “caracol terrestre” replica el símbolo de la espiral en tres dimensiones, tanto en el aspecto exterior como en su espacio interno, siguiendo el eje formado por una línea imaginaria que une el ápice con la columela. Es evidente que los modelos de templos con rampa en espiral tienen el mismo concepto. En efecto, estas representaciones escultóricas de templos rematan en un templete (Zevallos, 1985: 165) (Fig. 15) que a veces está ocupado por un personaje de alto rango (Wiersema, 2012: Fig. 10; 2016: fig. 76). En estos modelos, una fila de caracoles terrestres -símbolo de humedad- en movimiento asciende por el borde de la rampa en espiral, en dirección a la cima del edificio; y usualmente una fila de zorros representada en las paredes de estos modelos arquitectónicos va en la misma dirección.



Figura 15. Caracoles terrestres y zorros ascendiendo en un modelo arquitectónico con rampa en espiral.

Estimamos que la fila de caracoles terrestres en movimiento ascendente refuerza el simbolismo de estos modelos en espiral, y nos permite ubicar la escena en los solsticios de verano o invierno, o -excepcionalmente- en la ocurrencia de ENOS, teniendo en cuenta que los caracoles salen fuera de sus conchas sólo cuando se

dan condiciones de mayor humedad, conforme lo hemos indicado anteriormente; lo cual le confirió una importante connotación en la cosmovisión mochica. Aún más, en estas circunstancias, la tendencia de los *Scutalus* es seguir un recorrido ascendente, cuando están en una superficie vertical (roca, cactus, árboles), tanto de día como de noche (con garúa o lluvia). Creemos que este movimiento continuo de los caracoles en los modelos arquitectónicos, establece una conexión vertical entre la base y la cima del templo, y es un indicador del paso del tiempo, así como de la presencia de agua. Cabe reiterar que el caracol suele ocultarse en el día para lo cual busca un lugar fresco, bajo sombra, para adherirse y evitar la luz del sol.

Por su parte, el “zorro costeño” *Lycalopex sechurae*, mamífero omnívoro que vive entre la parte suroeste de Ecuador y la costa central del Perú (Cuentas, 2016: 129, 132; García, 2014: 23; Matsuno, 2018: 2, 4; Medina et al, 2021: 41, cuadro 1), puede ser observado en el día; sin embargo, tiene hábitos principalmente nocturnos; vive solitario (García, 2014: 16, 26; tabla 5; Matsuno, 2018: 131, 139) y “...ocupa diferentes hábitats como los desiertos costeros, zonas agrícolas, lomas costeras y bosques secos” (Matsuno, 2018: 132), donde también hay caracoles terrestres; asimismo, su patrón de actividad es mayor en las fuentes de agua que en los senderos (García, 2014: 23, fig. 9). En consecuencia, estamos ante un animal que, al igual que el caracol terrestre, puede ser visto de día, pero tiene mayor actividad nocturna, y de otro lado, ambos muestran afinidad por el agua, por consiguiente, el simbolismo del zorro refuerza el del caracol. Además, el dato etnográfico precisa que el zorro “Hoy, en las sierras del sur, es el perro de los espíritus de las montañas...” (Morote, 1988: 87), y que “...se puede advertir para el caso del zorro la condición de mediador y semideidad en la cosmovisión andina.” (Espino, 2014: 14); asimismo, “... para el imaginario quechua y aymara resulta portador de buenas o malas noticias para el calendario agrícola (también ritual)...” (Op. Cit.: 24).

La asociación “caracol terrestre”-zorro es evidente en una botella retrato de un personaje con pintura facial, el cual porta un turbante donde se observa una fila de zorros con la lengua húmeda afuera, que tienen en la nariz dos tentáculos oculares de caracol, y que -además- llevan un caparazón de *Scutalus* (Fig. 16). Un segundo ejemplo (de Bock, 1988, fig. 120), es el de un recipiente en el cual los caracoles tienen cabeza de zorro con dos tentáculos oculares y dos tentáculos táctiles-olfatorios (Fig. 17). En ambos casos, los animales híbridos están en actividad (fuera del caparazón), y por tanto aluden a la humedad; asimismo, consideramos que la representación del órgano de la visión del caracol refuerza el atributo de la visión nocturna del zorro. Adicionalmente, Quilter (2010: fig. 15) publicó un “florero” mochica que muestra a seis caracoles con cabeza de zorro, que sólo tienen dos apéndices oculares en la cabeza.



Figura 16. Animal híbrido: zorro-caracol en el turbante de un personaje mochica.

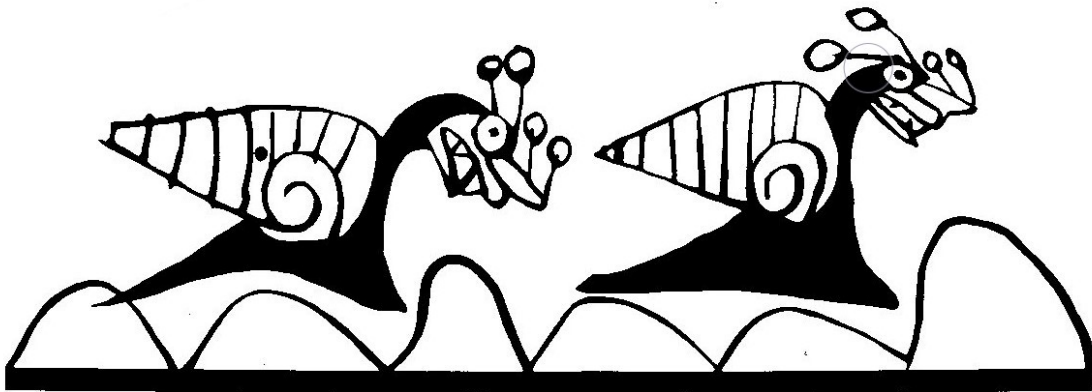


Figura 17. Animal híbrido: zorro-caracol en cerámica mochica (Fuente: de Bock, 1988).

Un tercer ejemplo (de Bock, 2000: fig. 27), se refiere a cinco animales que emergen del caparazón, y reúnen atributos de zorro, serpiente y caracol terrestre. La cabeza de zorro tiene dos tentáculos oculares de caracol, y el pie de este último ha sido

alargado para lograr el cuerpo de serpiente. Un sexto animal adopta la posición vertical, y repta hacia abajo, con la boca abierta. El tercer molusco de la fila tiene la cabeza vertical y hacia arriba, en dirección al sexto animal, estableciendo así una conexión (Fig. 18). En este último caso, la serpiente, además de significar regeneración (de Bock, 2012: 156), se vincula al agua; y la flora incorporada a la escena se asemeja al “palo verde” *Cercidium praecox*, característico del Piso Altitudinal Inferior de vegetación (Mostacero, et al, 2007: 144-146). En todos los ejemplos, los caparzones muestran el símbolo de espiral.

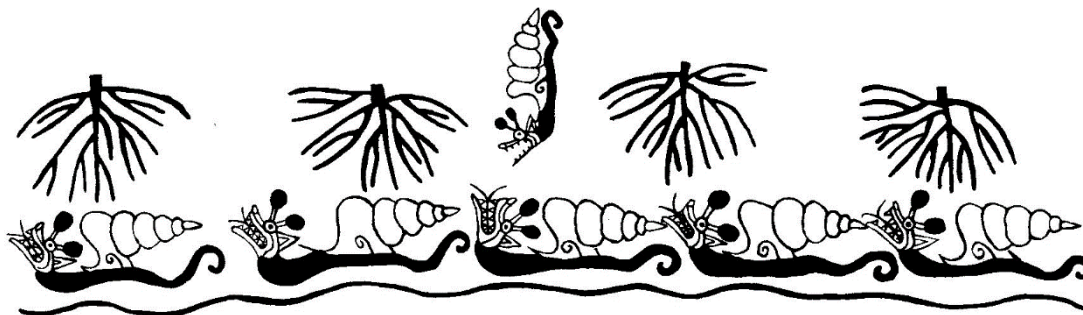


Figura 18. Animal con atributos de caracol terrestre, zorro y serpiente en cerámica mochica (Fuente: de Bock, 2000).

Finalmente, hay una representación del caracol terrestre en filas superpuestas, en los cuales se distingue el pie y la cabeza con sus dos tentáculos oculares y dos tentáculos táctiles-olfatorios (Fig. 19). Aun cuando no se muestran diseños adicionales, queda perfectamente claro que estas representaciones corresponden a un contexto de mayor humedad (agua).

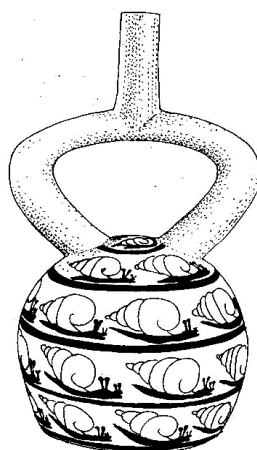


Figura 19. Caracoles terrestres en filas superpuestas, en una botella mochica (fase IV-V).

Escenas de sacrificio en la montaña

La aparición de caracoles terrestres en movimiento en escenas de sacrificio en la montaña (Hocquenghem, 1987: fig. 181, 186; Jia, 2019: p. 110; Jiménez, 1985: 24; Uceda et al, 2016: 152) permite situar a éstas en cualquiera de las condiciones ambientales que hemos indicado anteriormente: lomas (invierno), lluvias estacionales (verano) y ENOS. En este último caso, cabe mencionar el hallazgo de varones sacrificados en la plaza 3a de la Huaca de la Luna, los cuales se asociaban a capas de sedimentos generados por ENOS (Uceda y Morales, 2010: 82, fig. 154).

En una escena de sacrificio (Fig. 20) hay una serpiente bicéfala que une la base de la montaña con la cima, donde se ubica un ser humano (incompleto) recostado boca abajo y con el cabello suelto -metáfora de agua-, junto a un personaje sentado (incompleto: ¿el Dios de la Montaña?). Al respecto, la serpiente bicéfala es una característica del Dios de la Montaña y, por otra parte, “la serpiente es un símbolo universal de la regeneración, debido al cambio cíclico de su piel” (de Bock, 2012: 156) y su simbolismo denota agua. En la escena, los caracoles están activos, es decir, fuera de sus caparazones y muestran sus dos tentáculos oculares; además, están en la cima, y la ladera (parte media y baja) de la montaña. La escena se complementa con la “achupalla” *Tillandsia sp.*, cactáceas como “gigantón” *Neoraimondia arequipensis* y diversos arbustos propios del Piso Altitudinal Inferior de vegetación (150-400 o 500 msnm), que tiene clima árido a semi cálido (Mostacero et al, *Op. Cit.*: 144-146); en algunos arbustos hay reptiles (¿”cañan” *Dicrodon sp.*?) que usualmente pueden ser observados con mayor frecuencia en verano, así como un “ciempiés” (Arthropoda: Myriapoda: Chilopoda). Entonces, podemos interpretar el escenario como típico de la temporada de lluvias (verano) o de la ocurrencia de ENOS. Por otra parte, la *Tillandsia* es importante, porque “...parece combinar la muerte con el símbolo de la fertilidad: desde la parte inferior ‘muerta’ crece la parte superior viva con la flor” (de Bock, 2012: 141).

En otra escena (Fig. 21), los caracoles activos están dispersos en la cima y parte media de la ladera de una montaña. En la cima hay una persona en posición decúbiteo ventral, con el cabello suelto hacia abajo; en los picos de montaña hay varias figuras sentadas y en la parte media de la ladera se aprecian figuras en movimiento; incluyendo un personaje que carga un venado. En la parte baja de la montaña hay varios esqueletos, mas no la presencia de caracoles y vegetación. Es evidente una marcada separación entre la parte húmeda (cima y parte media de la ladera), donde además hay cactáceas (“gigantón” *Neoraimondia arequipensis*), y la parte seca (parte baja de la ladera), donde están los esqueletos. La serpiente reptante conecta ambas mitades (húmeda y seca) de la escena.



Figura 20. Caracoles terrestres en una escena de sacrificio en la montaña, en una botella mochica (fase II/III) (Fuente: Uceda et al, 2016).



Figura 21. Caracoles terrestres en una escena de sacrificio en la montaña (Fuente: Hocquenghem, 1987).

La asociación caracol – montaña es evidente en una botella donde aparece el Dios de la Montaña, rodeado de cerros en cuyas cimas hay caracoles activos (fuera de sus caparazones) (Fig. 22); es decir, en el punto culminante de su desplazamiento (Giersz y Przada-Giersz, 2008: fig. 1; Zevallos, 1985: 112), lo cual lleva a situar la escena en condiciones de mayor humedad. Dicho de otro modo, el caracol funciona como una metáfora del agua, incluso cuando son representados en movimiento y sin otra asociación. Al respecto, se ha propuesto que “...los caracoles también despliegan un importante motivo acuático” (de Bock, 2012: 143). Cuando los caracoles están en actividad, muestran la cabeza y pie fuera de sus caparazones. Por consiguiente, las escenas donde hay personajes en movimiento y caracoles activos, pueden ser interpretadas como escenarios donde está ocurriendo un evento pluvial o la presencia de neblina y garúa. Es decir, no se trata de escenas vinculadas únicamente con la “estación seca” (*vide* Hocquenghem, 1987: 179, 183; figs. 178, 186)



Figura 22. Caracoles en la cima de montañas, asociados al Dios de la Montaña, en una botella mochica (fase IV).

Este es el caso de una escena donde sobresalen cactáceas (“gigantón” *Neoraimondia arequipensis*, “cola de zorro” *Haageocereus sp.*), algunas con frutos (solsticio de verano) y arbustos, característicos del Piso Altitudinal Inferior de vegetación. En el plano superior, dos personajes con tocado llevan en una de sus manos un objeto alargado; y dos caracoles en actividad, uno en cada extremo del plano superior, se desplazan de izquierda a derecha, al igual que ambos personajes. En el plano intermedio, hay un sacerdote guerrero con turbante de dos penachos (en forma de cactus), de cuya espalda pende una prenda comparable con el “atuendo del felino” recuperado en Huaca de la Luna (Uceda et al, 2016: 20, 21): además, él porta un objeto alargado en la mano, y antecede a un individuo de alto rango que es llevado en andas. En el centro y a la derecha, se enfrentan dos parejas de guerreros de diferentes bandos. En el plano inferior, dos caracoles en actividad van de izquierda a derecha; sin embargo, un tercer molusco está en posición vertical –desplazándose de arriba hacia abajo– y muestra el pie y la cabeza con sus tentáculos oculares y tentáculos táctiles-olfatorios, denotando presencia de humedad. Finalmente, hay un caracol marino en posición vertical (Fig. 23). En nuestra opinión, el caracol terrestre en posición vertical y el cactus caído marcan una pausa entre los personajes de la izquierda y los guerreros en contienda. Por sus características, toda la escena se vincula a un ambiente húmedo.



Figura 23. Caracoles terrestres en una escena de combate con un dignatario en andas (Fuente: Hocquenghem, 1987).

Un pozo ceremonial

Este es un caso muy especial, que corresponde al pozo subterráneo de El Brujo, en el valle de Chicama (Quilter et al, 2012: 101-131); donde, si bien no se encontraron caracoles terrestres asociados, creemos que la comparación con el simbolismo de este molusco está justificada: el pozo fue construido mediante la excavación del duro suelo de la terraza natural, siguiendo un eje vertical imaginario equivalente a

la columela (columnilla) del caparazón del caracol terrestre. La abertura del pozo equivale a la boca o estoma del caparazón; y la construcción interna imita a su par metafórico: el espacio interior del caparazón (Figs. 24, 25); por ello uno de los rasgos principales del pozo es la escalinata en espiral mediante la cual se desciende desde la superficie hacia el inframundo, en sentido antihorario (*Op. Cit.*, figs. 3, 4) hasta llegar a una fuente de agua que se beneficia de la capa freática (*Op. Cit.*, fig. 3), y cuyo nivel se incrementa cuando acontecen fuertes lluvias. Por el contrario, el ascenso hasta la superficie tenía lugar en sentido horario (girando hacia la derecha). Podemos decir, entonces, que el fondo del pozo equivale al ápice del caparazón, en dirección al cual el molusco se repliega cuando ha absorbido suficiente agua y nutrientes; después de lo cual cierra la estoma con un opérculo. El agua del pozo es el resultado final del ciclo del agua en el solsticio de verano; en la medida que en tales condiciones la capa freática se alimenta de la filtración de agua pluvial. Debemos destacar que mientras en la superficie del valle, el agua pluvial se colecta en los ríos que finalmente desembocan (“mueren”) en el mar, el agua subterránea del pozo no tiene movimiento, permanece siempre (no “muere”). De manera que esta agua subterránea tuvo -sin duda- otro significado que debió ser relevante en los rituales vinculados al pozo.



Figura 24. Pozo ceremonial con rampa en espiral, en El Brujo, valle de Chicama (Fuente: Franco et al, 2005).

Resulta sugerente el hecho que cuando concluyó su función el pozo ceremonial, los mochicas colocaran a un difunto cerca de la fuente de agua, y rellenaran la estructura con tierra en un solo evento. Es probable que en el pozo se realizaron rituales vinculados al agua, hecho que es coherente con la naturaleza del caracol terrestre, que también simboliza agua. Aún más, el molusco se alimenta de agua pluvial, que forma parte del ciclo del agua, y *la transporta* consigo.

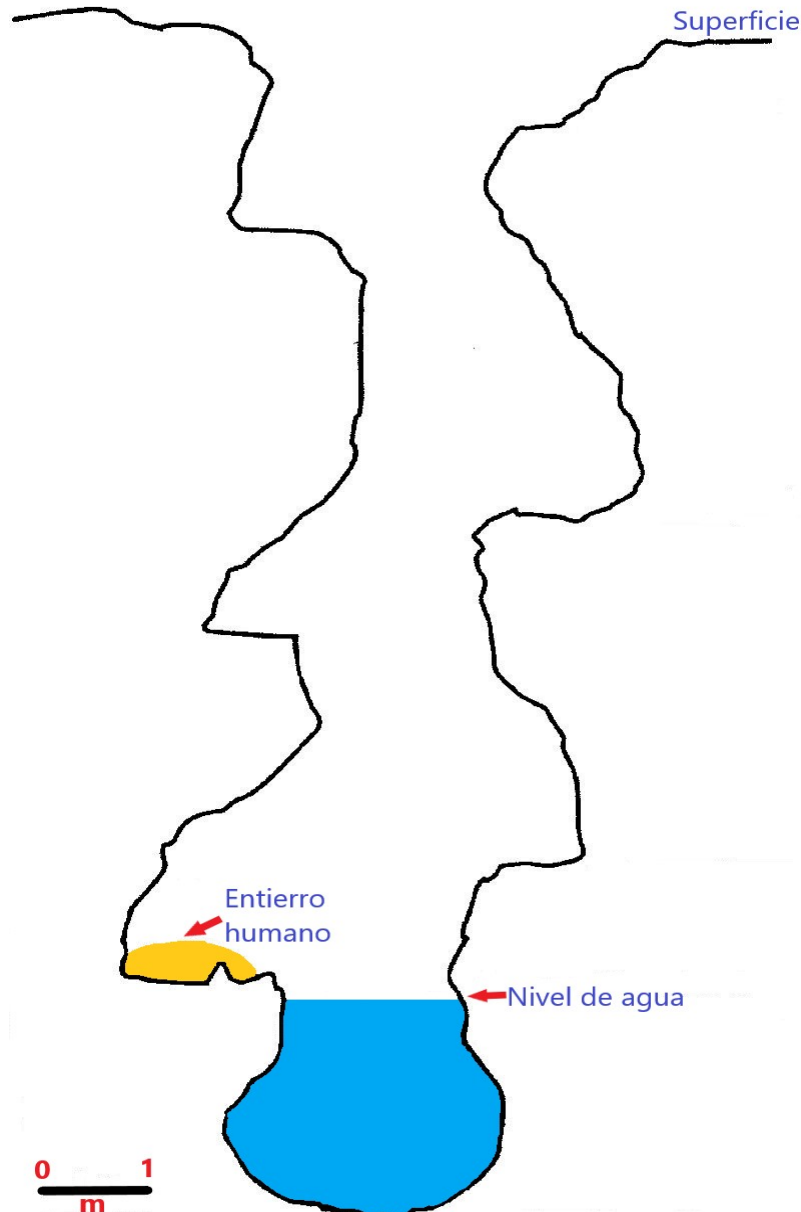


Figura 25. Sección del pozo ceremonial de El Brujo (Adaptado de Quilter et al, 2012).

Comentario final

La información etnográfica prueba la presencia del “caracol terrestre” *Scutalus spp.* en los solsticios de invierno (lomas) y de verano (precipitaciones pluviales), que son dos límites importantes en el tiempo y están relacionados con el simbolismo de la transición entre la vida y la muerte en un ritual funerario. Asimismo, aparece excepcionalmente cuando ocurre El Niño/Oscilación del Sur (“desierto florecido”). En este marco, la representación de *Scutalus* en escenas de recolección, de sacrificio en la montaña, entre otras, puede ser vinculada a cualquiera de esos tres escenarios que también acontecieron en el pasado.

En esta perspectiva, este molusco deviene metáfora del agua, y la morfología de su caparazón desarrolla el símbolo del espiral en tres dimensiones, comparable con templos con rampa en espiral de la cerámica mochica. Símbolo que está vinculado al agua (de Bock, 2003: 312-313; 2012: 143). Estos modelos arquitectónicos y construcciones subterráneas como el pozo ceremonial de El Brujo tienen el mismo concepto. Ambos modelos son compatibles con la morfología externa e interna del caparazón de *Scutalus spp.*, respectivamente.

Asimismo, la conducta del animal a lo largo de su vida se caracteriza por un constante cambio cíclico, que varía desde su animación, cuando hay óptimas condiciones de humedad (neblina, lluvias), y salida de la oscuridad (el interior del caparazón) hacia la luz (mundo exterior); hasta su ocultamiento en el caparazón (muerte metafórica) que es cerrado por el opérculo, cuando cesan las condiciones de mayor humedad. Ciclo que se repetirá a lo largo de la vida del “caracol terrestre”.

Agradecimiento

Los autores agradecen a Edward de Bock por la lectura y apreciación crítica de la primera versión del manuscrito. Nuestro reconocimiento a Noa Corcoran-Tadd y Bettina Smith por su ayuda para obtener la autorización para publicar dibujos de Donna McClelland que forman parte del Moche Archive, Dumbarton Oaks, Trustees for Harvard University, Washington, D.C. (figs. 7, 8, 9 y 14 del presente artículo); asimismo, a Ricardo Morales (fig. 20) y a Edward de Bock (figs. 17 y 18).

Referencias bibliográficas

Breure A (1979): Systematics phylogeny and zoogeography of Bulimulidae (Mollusca). *Zoologische Verhandlige* 168 (1): 3-200.

- Chauchat C, Gálvez C, Briceño J, Uceda S (1998): Sitios arqueológicos de la zona de Cupisnique y margen derecha del valle de Chicama, 169p.; Patrimonio Arqueológico Zona Norte. *Travaux de l'Institut Français d'Etudes Andines* 113. Lima: Instituto Nacional de Cultura-La Libertad – Instituto Francés de Estudios Andinos.
- Cuentas M (2016): Análisis del hábitat del zorro costeño (*Lycalopex sechurae*) en el departamento de Lambayeque y propuesta de corredores ecológicos con herramientas SIG. *Espacio y Desarrollo* 28: 129-152. <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/espaciodesarrollo/article/view/15008/16121>
- de Bock E (1988): *Moche. Gods, warriors, priests. Peru 0-650 / A. Chr.*, 135 p.; Leiden: Rijksmuseum voor Volkenkunde.
- de Bock E (2000): *The Leiden painter. Schilderkunst op aardewerk uit Peru*, 63 p.; Leiden: Rijksmuseum voor Volkenkunde.
- de Bock E (2003): Templo de la escalera y la ola y la hora del sacrificio humano. *Hacia el Final del Milenio*, Vol. II: 307-324, editores Santiago Uceda y Elías Mujica, Universidad Nacional de Trujillo y Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima.
- de Bock E (2012): *Sacrificios humanos para el orden cósmico y la regeneración. Estructura y significado en la iconografía Moche*, 187 p.; Trujillo: Ediciones SIAN.
- Donnan C (1985): Arte Moche. *Moche*, editado por José Lavalle, Pp. 53-95. Banco de Crédito del Perú, Lima.
- Espino G (2014): *Atuqpacha. Memoria y tradición oral en los Andes*, 399 p.; Lima: Universidad Nacional Federico Villarreal.
- Franco R, Gálvez C, Vásquez S (2005): *El Brujo: pasado milenario*. Trujillo, Perú. Ediciones Sian.
- Gálvez C (1992): Un estudio de campamentos paijanenses en la Quebrada Cuculicote, valle de Chicama. *Estudios de Arqueología Peruana*, editado por Duccio Bonavia, Pp. 21-43. Asociación Peruana para el Fomento de las Ciencias Sociales, Lima.

Gálvez C (2017): El espiral en la arquitectura ceremonial mochica. Metáfora, símbolo y realidad. *Arkinka* 262: 82 – 87.

Gálvez C, Castañeda J, Becerra R (1993): Caracoles terrestres: 11,000 años de tradición alimentaria en la costa norte del Perú. *Cultura, Identidad y Cocina en el Perú*, compilado por Rosario Olivas, Pp. 55-147. Universidad San Martín de Porres, Lima.

Gálvez C, Runcio MA (2010): Iconografía y uso del espacio en los recintos con estructuras en forma de “U” del Conjunto Nik An (Chan Chan). *Pueblo Continente. Revista Oficial de la Universidad Privada Antenor Orrego* 21 (1): 83 - 92.

Gálvez C, Castañeda J, Runcio MA, Espinoza M (2012): Geoglifos, ocupación y uso del espacio en el valle medio de Chicama, costa norte del Perú. *Actas del VI Coloquio Binacional Argentino-Peruano*, editado por María de Haro, Ana Rocchietti, María Runcio, Odlanyer Hernández y María Fernández, Pp. 87-108. Centro de Investigaciones Precolombinas, Buenos Aires.

García A (2014): Patrones de actividad de mamíferos mayores y una comparación de metodologías con cámaras trampa en el Bosque Seco Ecuatorial de Lambayeque. MS, tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Piura. Piura. <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/237/BIO-GAR-OLA4.pdf;jsessionid=9E8A8058BE14083EDC4A345AEBB09FFD?sequence=1>

Giersz M, Przadka-Giersz P (2008): Las imágenes escultóricas de los seres sobrenaturales mochica en la colección del Museo Arqueológico Rafael Larco Herrera y el problema de la identificación de las deidades; una aproximación estadística. *Arqueología mochica. Nuevos enfoques. Actas del Primer Congreso Internacional de Jóvenes Investigadores de la cultura Mochica*, editado por Luis Castillo, Hélène Bernier, Gregory Lockard y Julio Rucabado, Pp. 219-230. Instituto Francés de Estudios Andinos y Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.

Gillin J (1947): *Moche, a peruvian coastal community*, 166 p. + 26 láms. Washington D. C.: Smithsonian Institution, Institute of Social Anthropology, Publication 3.

Golte J (1985): Los recolectores de caracoles en la cultura Moche (Perú). *Indiana* 10 (2): 355-369.

Heck J (2015): *Die Inka in Europa*, 407 p.; Borsdorf: Edition Winterwork.

- Hocquenghem A (1987): *Iconografía mochica.*, p. 280 + 214figs.; Lima: Pontificia Universidad católica del Perú.
- Jia D (editor) (2019): *Ancient civilization of the Andes. Illuminating the origins of the Inca Empire*, 323 p.; Shangai: Shangai Youxiang Art Exhibitions and Exchange Development Co. Ltd.
- Jiménez A (1985): Introducción a la cultura Moche. *Moche*, editado por José Lavalle, Pp. 17-51. Banco de Crédito del Perú, Lima.
- King H (2012): *Peruvian featherworks. Art of the precolumbian era*, 222 p.; New York: The Metropolitan Museum of Art.
- Kutscher G (1977): *Chimu, eine altindianische hochkultur*, 110 p.; Berlin: Gerstenberg Verlag-Hildesheim.
- Larco R (1966): *Peru*, 244 p.; Cleveland y New York: Series Archaeologia Mundi. The World Publishing Company.
- Larco R (2000): *Los Mochicas*. Tomo 1, 333 p.; Lima: Museo Arqueológico Rafael Larco Herrera.
- Lau G (2022): Sacred landscapes, time and livelihoods. *Peru a Journey in time*, editado por Cecilia Pardo y Jago Cooper, Pp. 54-55. The British Museum, Londres.
- Lavalle J (Ed.) (1985): *Moche*, 241 p.; Lima: Serie Culturas Precolombinas, Colección Arte y Tesoros del Perú. Banco de Crédito del Perú.
- Matsuno M (2018): Evaluación coproparasitológica en zorros de Sechura (*Lycalopex sechurae*) que habitan en el área natural protegida "Santuario Histórico Bosque de Pómac". MS, tesis para optar el título profesional de médico veterinario, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/9472/Matsuno_rm.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Medina C, Zelada W, Seminario M, Rodríguez C (2021): Red trófica asociada al sapote (*Colicodendron scabridum*) en el Área de Conservación Privada Lomas del Cerro Campana, La Libertad, Perú. *Revista de Investigación Científica REBIOL*, 41(1): 35-48.
<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/3598/4275>

- Morote E (1988): *Aldeas sumergidas. Cultura popular y sociedad en los andes*, 366p.; Cusco: Centro de Estudios Rurales Andinos "Bartolomé de las Casas".
- Mostacero J, Mejía F, Zelada W, Medina C (2007): *Biogeografía del Perú*, 375p.; Lima: Asamblea Nacional de Rectores.
- Mujica E (2007): *El Brujo. Huaca Cao, centro ceremonial moche en el valle de Chicama*. 339 p.; Lima: INC Fondos y AFP Integra.
- Netherly P (1977): *Local level gods on the north coast of Peru*. MS doctoral dissertation, Cornell University, Ithaca.
- Pillsbury J, Potts T, Richter K (editores) (2017): *Golden kingdoms. Luxury arts in the ancient Americas*, 311 p.; Los Angeles: The J. Paul Getty Museum and The Getty Research Institute.
- Pozorski S (1976): Prehistory subsistence patterns and site economies in the Moche valley, Peru. MS doctoral dissertation, The University of Texas at Austin, Austin.
- Quilter J (2010): *The Moche of ancient Peru. Media and messages*. 154p.; Cambridge: Peabody Museum Press.
- Quilter J, Franco R, Gálvez C, Donnan W, Gaither C, Vásquez V, Rosales T, Jiménez J, Starratt H, Koons M (2012): The well and the huaca: Ceremony, chronology, and culture change at Huaca Cao Viejo, Chicama valley, Peru. *Andean Past* 10: 101-131.
- Ramírez J, Ramírez R, Romero P, Chumbe A, Ramírez P (2009): Posición evolutiva de caracoles terrestres peruanos (Orthalicidae) entre los Stylommatophora /Mollusca: Gastropoda). *Revista Peruana de Biología* 16 (1): 51-56.
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/193/184>
- Reinhard J (1987): Chavín y Tiahuanaco. Una nueva perspectiva de los centros ceremoniales andinos. *Boletín de Lima* 50: 29-49.
- Reinhard J (1992): Sacred peaks of the Andes. *National Geographic* 181 (3): 84-111.
- Topic J (1992): Las huacas de Huamachuco; precisiones en torno a una imagen indígena de un paisaje andino. *La persecución del demonio. Crónica de los*

primeros agustinos del norte del Perú (1560), por Fray Juan de San Pedro, Pp. 41- 99. Editorial Algazara y Centro Andino Mesoamericano de Estudios Interdisciplinarios, Málaga.

Ubbelohde-Doering H (1983): *Vorspanische gräber von Pacatnamú*, 131p.; Munich: Materialien zur Allgemeine und Vergleichenden, Vol. 5. Kommission für Allgemeine und Vergleichende Archäologie des Deutschen Archäologischen Instituts Bonn.

Uceda S, Morales R (editores) (2010): *Moche pasado y presente*, 280 p.; Trujillo: Patronato Huacas del Valle de Moche, Fondo Contravalor Perú Francia y Universidad Nacional de Trujillo.

Uceda S, Morales R, Mujica E (2016): *Huaca de La Luna. Templos y dioses moches*, 319 p.; Trujillo: Fundación Backus y World Monuments Fund Perú.

Vásquez V, Rosales T (2012): Análisis zooarqueológico de los conjuntos arquitectónicos CA-27, CA-35 y de la plaza 3 del núcleo urbano moche. *Investigaciones en la Huaca de Luna 2003*, editado por Santiago Uceda, Elías Mujica y Ricardo Morales, Pp. 289-334. Patronato Huacas del Valle de Moche y Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.

Vásquez V, Rosales T (2008): Análisis del material orgánico de los conjuntos arquitectónicos CA30 y CA35, núcleo urbano moche, Huaca de la Luna. *Investigaciones en la Huaca de la Luna 2002*, editado por Santiago Uceda, Elías Mujica y Ricardo Morales, Pp. 170-183. Patronato Huacas del Valle de Moche y Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.

Vásquez V, Rosales T (2016): Análisis de restos de fauna y botánicos de CA45, CA52, CA55 y CA57-Huaca de la Luna, temporada 2015. *Investigaciones en la Huaca de La Luna 2015. Proyecto Canon Minero 2015. El urbanismo en el sitio huacas del Sol y de la Luna, valle de Moche: la emergencia de la ciudad en los Andes Centrales*, editado por Santiago Uceda, Ricrdo Morales y Henry Gayoso, Pp.261-287. Patronato Huacas del Valle de Moche y Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.

Vergara E (2015): *Mates. Corpus iconográfico Perú prehispánico*, 509p.; Trujillo: Imprenta Gami S. A. C.

Vitry C (2007): Caminos rituales y montañas sagradas. Estudio de la vialidad Inka en el nevado de Chañi, Argentina. *Boletín del Museo Chileno de Arte Precolombino* 12 (2): 69-84.

Wester C (2016): *Chornancap “Palacio de una gobernante y sacerdotisa de la cultura Lambayeque”*, 427 p.; Chiclayo: Proyecto Especial Naylamp-Lambayeque y Museo Arqueológico Nacional Brüning.

Wester C (2018): *Personajes de élite en Chornancap. Una nueva visión de la cultura Lambayeque*, 369 p.; Chiclayo: Proyecto Especial Naylamp-Lambayeque y Museo Arqueológico Nacional Brüning.

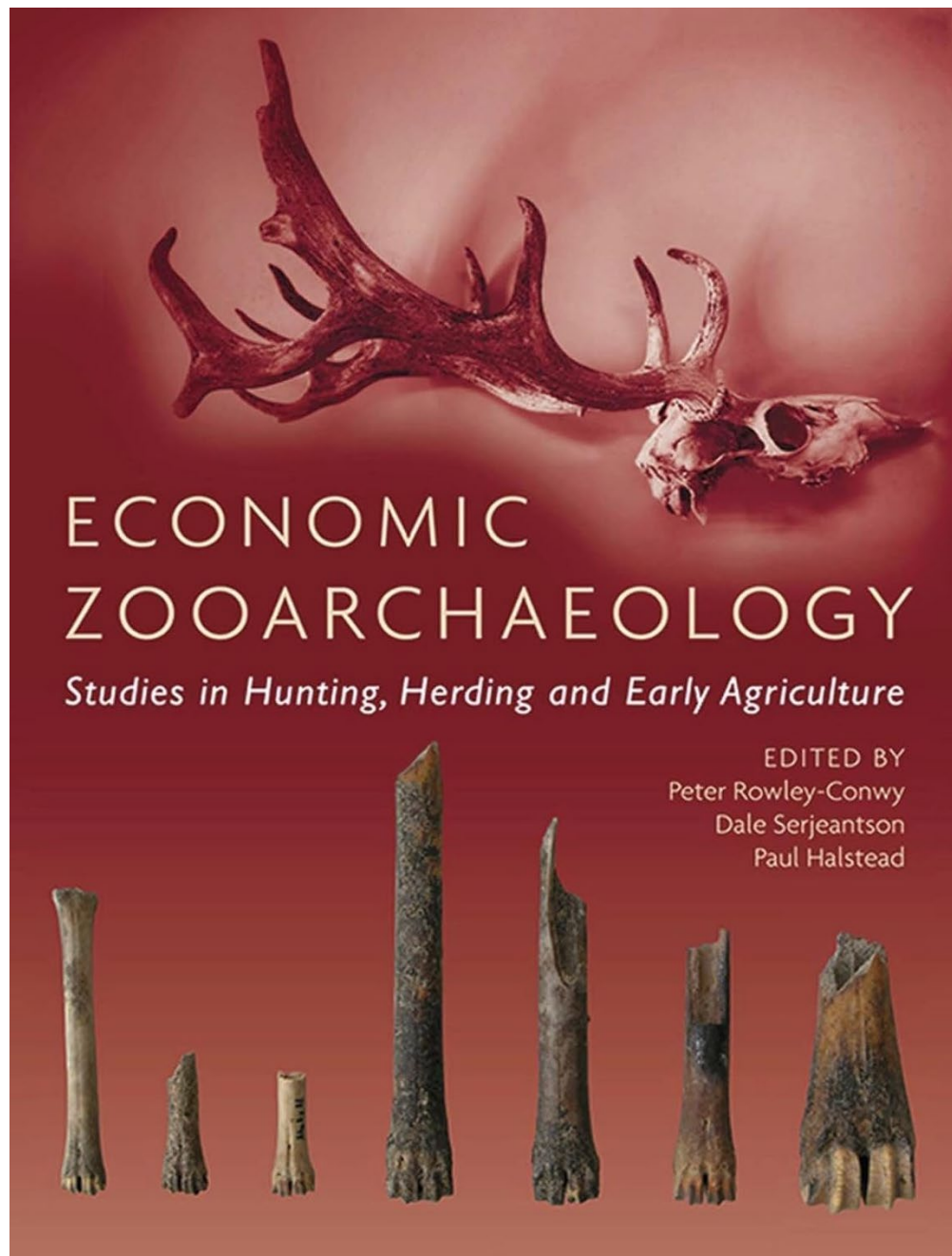
Wiersema J (2012): Moche architectural vessels: small structures, big implications. *Andean Past* 10: 101-131.

Wiersema J (2016): The art of ancient andean architectural representations. *Designe for eternity. Architectural models from the ancient Americas*, editado por Dale Tucker, Pp. 55-79. The Metropolitan Museum of Art, New York.

Zevallos J (1985): Área y fases de la cultura Moche. *Moche*, editado por José Lavalle, Pp. 96-126. Banco de Crédito del Perú, Lima.



LIBROS PUBLICADOS



El libro trata sobre el estudio de cómo los pueblos del pasado explotaron los animales y las plantas, utilizando como evidencia los restos de esos animales y plantas. La parte animal suele denominarse zooarqueología, la parte vegetal arqueobotánica. Lo que los distingue de otros estudios sobre animales y plantas antiguos donde su objetivo final es conocer el comportamiento humano; los restos de animales y plantas son un medio para lograrlo. El libro contiene 33 artículos con una amplia gama de temas que cubren muchas áreas de

interés arqueológico. Se cubren aspectos de método y teoría, identificación de huesos de animales, paleopatología humana, utilización de animales prehistóricos en América del Sur y el estudio de los cementerios de perros.

POLÍTICA EDITORIAL

La revista "ARCHAEOBIOS" tiene como meta realizar una publicación anual, en español e inglés y será un medio de difusión masivo donde especialistas nacionales y extranjeros puedan enviar manuscritos producto de sus investigaciones en Bioarqueología. La revista tendrá arbitraje, lo que implica que todos los artículos de investigación, artículos de revisión y notas técnicas remitidos al editor serán revisados por un equipo de expertos que conforman el comité editorial, los cuales después de una evaluación cuidadosa nos permitirá otorgar la aceptación para su publicación en la misma.

SECCIONES:

Los artículos de investigación, artículos de revisión y notas técnicas deben enviarse en soporte informático (CD) al responsable de la edición de la revista, por correo y/o al correo electrónico (<vivasa2401@yahoo.com>).

1.- Artículos de Investigación:

Los artículos deben ser redactados en español e inglés. No deben exceder de 25 páginas de 3000 caracteres cada una (incluyendo bibliografía, ilustraciones y notas). Los artículos deben estar acompañados del nombre, apellido, función, dirección de la institución y correo electrónico del o de los autores; del resumen del artículo en los dos idiomas, aproximadamente 700 caracteres cada uno; de un máximo de seis palabras claves (descriptores) en los dos idiomas; de la traducción del título a los dos idiomas, y de un contenido con: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones y Referencias Bibliográficas.

2.- Artículos de Revisión:

Un artículo de revisión tiene como finalidad examinar la bibliografía publicada sobre un tema especializado y/o polémico, y situarla en una perspectiva adecuada para que su utilización en las interpretaciones bioarqueológicas sea adecuada. La revisión se puede reconocer como un estudio en sí mismo, en el cual el revisor tiene un interrogante, recoge datos, los analiza y extrae una conclusión. Estos artículos deben ser redactados en español e inglés. No deben exceder de 25 páginas de 3000 caracteres cada una (incluyendo bibliografía, ilustraciones y notas). Los artículos deben estar acompañados del nombre, apellido, función, dirección de la institución y correo electrónico del o de los autores; del resumen del artículo en los dos idiomas, aproximadamente 700 caracteres cada uno; de un máximo de seis palabras claves (descriptores) en los dos idiomas; de la traducción del título a los dos idiomas, y el contenido del mismo es de formato libre.

3.- Notas Técnicas:

Las notas técnicas deben ser redactadas en español e inglés. No deben de exceder de 4 páginas a espacio simple con 3000 caracteres cada una (incluye la bibliografía e ilustraciones). Deben estar acompañados del nombre, apellido, función, dirección de la institución y correo electrónico del o de los autores. Las notas técnicas deben estar referidas a temas nuevos donde se resaltan

metodología y tecnologías que se aplican en las investigaciones bioarqueológicas, o comentarios técnicos sobre algún tema relevante en bioarqueología.

4.- Ilustraciones (mapas, figuras, cuadros, fotos, etc.):

Todas las ilustraciones, numeradas y señaladas en el texto, deben ser entregadas en su forma definitiva, en soporte informático y con la indicación del programa utilizado (mapas y figuras en formato vectorial).

Cada ilustración debe identificarse con un número y acompañarse por: el apellido de su autor, de un título; de las fuentes; de una leyenda explicativa de hasta 150 caracteres.

Las fotos en lo posible deben ser de formato digital en alta resolución (2 mb como mínimo), aunque pueden ser escaneadas en alta resolución o entregadas en papel de buena calidad (formato 15 cm x 10 cm). Los mapas, planos, esquemas vienen acompañados de una escala gráfica, de la orientación y de una leyenda.

4.- Referencias Bibliográficas:

La bibliografía debe incluir todas las referencias citadas en el texto y sólo éstas. Las referencias bibliográficas se presentan al final del artículo, en una lista ordenada alfabéticamente. Los títulos de las revistas y los nombres de los organismos se indicarán completos (no están permitidas las siglas). Las referencias se presentarán bajo el formato indicado a continuación:

Referencias para Libros:

Estenssoro JC (2003): *Del paganismo a la santidad. La incorporación de los indios del Perú al catolicismo 1532-1750*, 586 p.; Lima: Instituto Francés de Estudios Andinos (IFEA) - Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) Fondo Editorial.

Referencias para Artículos en Libros:

Barton H, Fullagar R (2006): *Microscopy*. In: *Ancient Starch Research* Edited by Robin Torrence and Huw Barton, Chapter 3, Pp. 47-52.

Referencias para Artículos de Revistas:

Han XZ, Hamaker BR (2002): *Location of Starch Granule-associated Proteins Revealed by Confocal Laser Scanning Microscopy*. *Journal of Cereal Science* 35:109–116.

5.- Evaluación:

El manuscrito será evaluado por el comité editorial de la Revista *ARCHAEOBIOS*. Los informes cuyo responsable puede quedarse en el anonimato, serán enviados a los autores. Si las correcciones solicitadas son de importancia menor, el manuscrito será aceptado para su publicación sin ser enviado de nuevo al evaluador. Si las correcciones son mayores, el manuscrito será mandado nuevamente al evaluador. En caso de una segunda evaluación negativa, el artículo será definitivamente rechazado. Cualquier manuscrito que no respete estas instrucciones (extensión, ilustraciones no conformes a la calidad requerida por la Revista *ARCHAEOBIOS*) será devuelto a los autores para su corrección sin ser evaluada.