

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 poliácridamida 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.

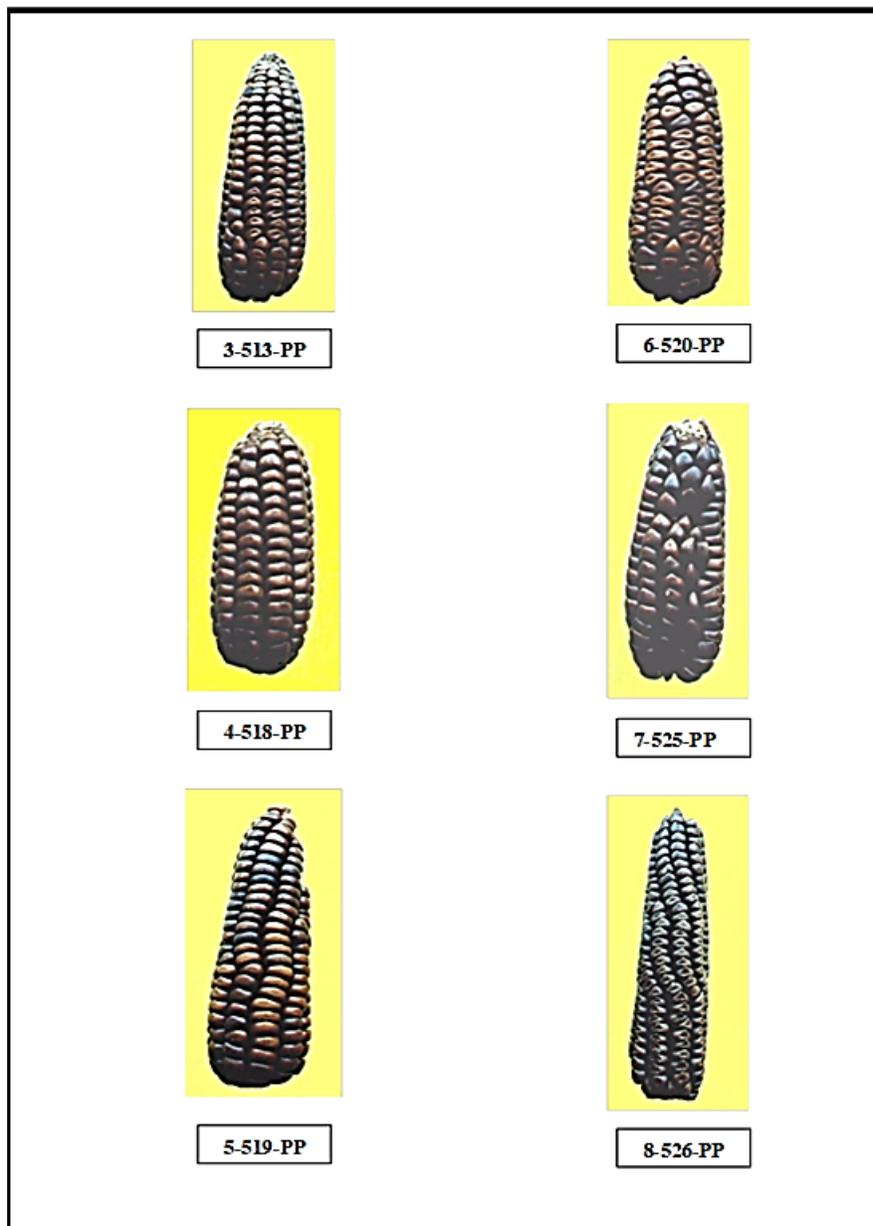


Figura 2.- Colecciones de maíz (*Zea mays*) arqueológico Chimú

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.

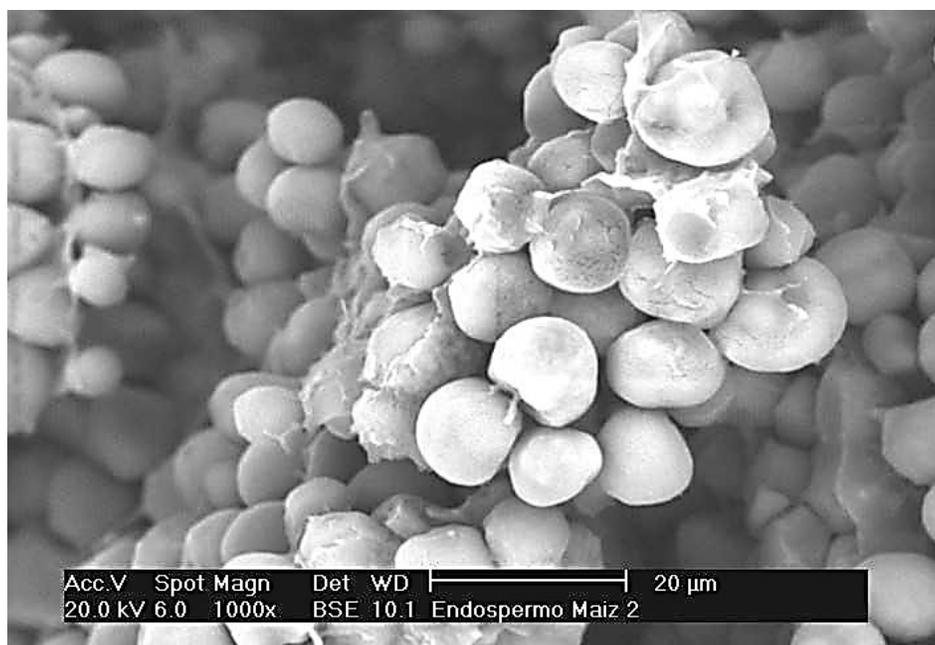


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido. Topografía del endospermo de semillas arqueológicas de maíz Chimú (*Zea mays*). Las muestras se tiñeron al vacío con oro y se amplificaron 1000X.

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).

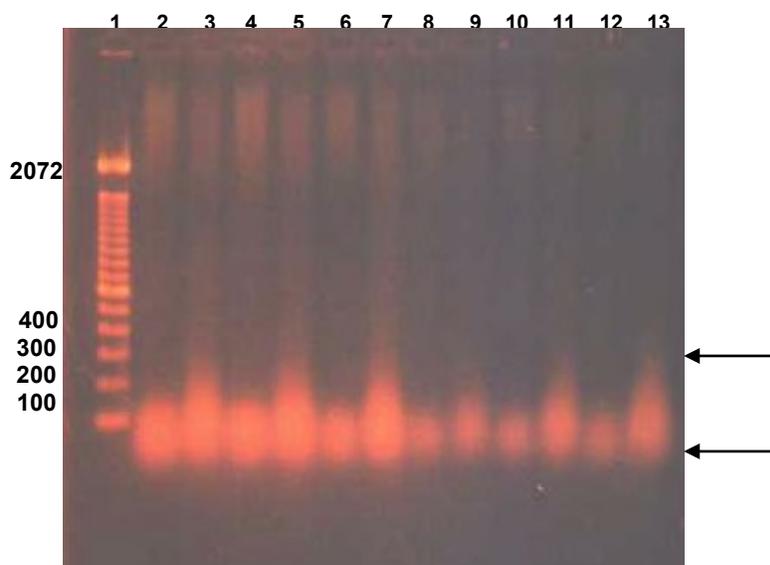


Figura 4. Ácidos nucleicos totales de colecciones arqueológicas de maíz Chimú (*Zea mays*). Las muestras se cargaron en geles de agarosa al 2% (p/v) y se fotografiaron bajo luz ultravioleta, después de la tinción con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de peso molecular en "escalera de 1.000 pb"; carriles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

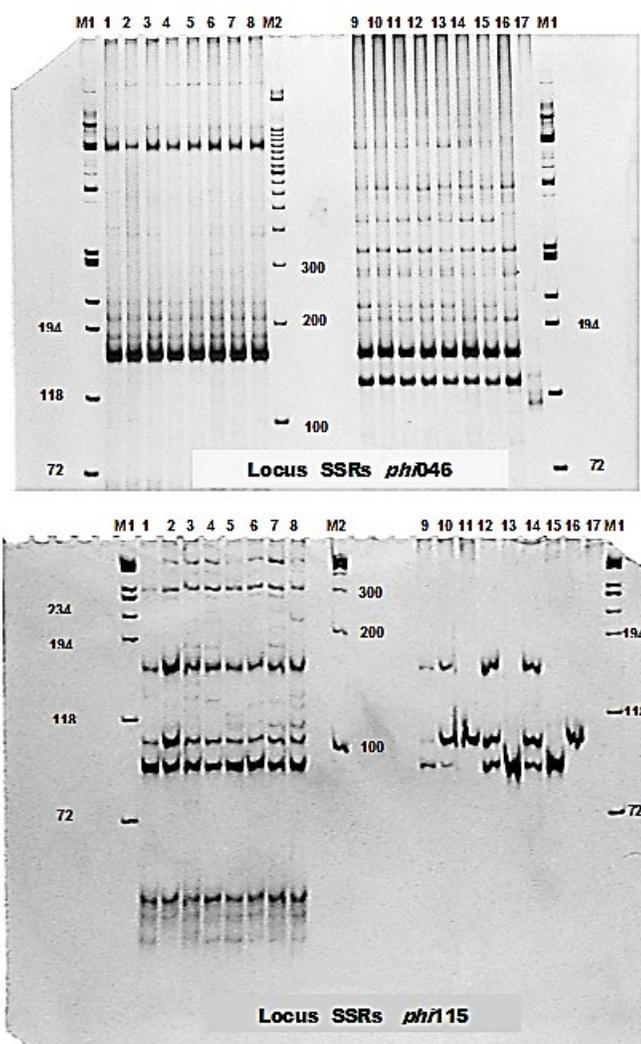


Figura 5. Productos de amplificación por PCR de maíz (*Zea mays*) tanto arqueológico como moderno. El ADN genómico se amplificó utilizando los pares de cebadores STR phi046 y phi115, se segregó en geles de poliacrilamida al 12% (p/v) y se tiñó con nitrato de plata. Carriles M1 y M2: marcadores de peso 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.

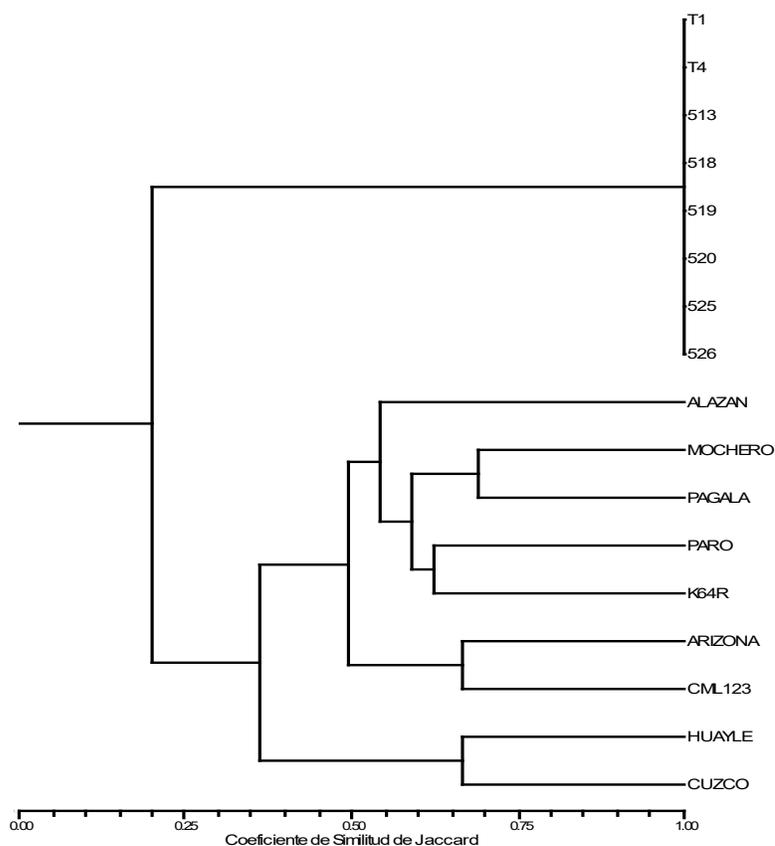


Figura 6. Árbol filogenético. El dendrograma se construyó con marcadores STR utilizando el algoritmo UPGMA. Muestra los parentescos de diversidad genética de ocho muestras arqueológicas Chimú, siete razas nativas modernas y dos cultivares mejorados de maíz (*Zea mays*).

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 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, 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).

