

El estudio de ADN humano de época almohade y actual revela la influencia migratoria norteafricana en Priego de Córdoba

MARÍA JOSÉ CASAS
CEES Universidad de Oslo

RESUMEN

Hemos estudiado secuencias de ADN mitocondrial así como polimorfismos de restricción de una muestra de 71 individuos de tres áreas de necrópolis musulmana de los siglos XII-XIII descubiertas en Priego de Córdoba y de 108 voluntarios de la población actual de la misma zona geográfica. El estudio ha revelado una mayor similitud de la población medieval con las poblaciones actuales del Noroeste de África así como una mayor proporción de linajes de origen subsahariano en el medievo que en la actualidad. El aumento de movimientos migratorios en épocas más recientes sería el principal responsable de que la población prieguense actual sea más similar al resto del Sur de la Península Ibérica que a la población medieval de la misma área.

PALABRAS CLAVE: ADN antiguo, ADN mitocondrial, *Al-Andalus*, migraciones humanas norteafricanas.

ABSTRACT

We have analyzed mitochondrial DNA sequences and restriction fragment polymorphisms in a sample of 71 individuals from three Islamic 12th-13th century burial areas excavated in Priego de Cordoba, as well as in a sample of 108 living donors of the same geographical area. The study shows a higher similarity between the medieval population and the present North West African populations and a higher proportion of sub-Saharan African lineages in Medieval times than in present days. The increase of migratory movements in modern times could be the main responsible for the higher similarity of the present population from Priego to the rest of the South Iberian Peninsula than to the medieval Priego sample.

KEY WORDS: Ancient DNA, mitochondrial DNA, *Al-Andalus*, North African human migrations.

ADN DE POBLACIONES HUMANAS DEL PASADO

Cuando a finales de los años 80 se extraía por primera vez ADN humano procedente de tejido óseo (Hagelberg *et al.*, 1989), se abrió un nuevo campo de estudio acerca de la variabilidad biológica de las poblaciones humanas del pasado. Hasta entonces ese estudio se circunscribía a trabajos relativos a características morfológicas sobre los restos de dichas poblaciones, o al análisis de los rasgos morfológicos, fisiológicos o moleculares de poblaciones actuales, a partir de los cuales era posible hacer sólo inferencias sobre la diversidad genética de sus ancestros. Sin embargo, el análisis del ADN antiguo comenzó a suministrar de manera directa información acerca de la diversidad genética humana en el pasado, aportando,

además de nuevos métodos para la determinación sexual y la identificación individual, datos fundamentales e "inmediatos" acerca del parentesco de los individuos, de la distancia génica entre poblaciones, de marcadores genéticos de patologías, de la procedencia de pueblos migrantes y su contribución al acervo genético local, de la historia evolutiva de las poblaciones o de la de sus agentes patógenos.

Actualmente se dispone de metodologías de trabajo sobre material óseo o dentario eficaces, tanto para la eliminación de la contaminación superficial como para la extracción del ADN (Hagelberg y Clegg, 1991; Höss y Pääbo, 1993; Cano y Poinar, 1993; Yang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1997; Krings *et al.*, 1997). Igualmente el método de amplificación mediante PCR, analizando fragmentos de ADN de menos de 200 pares de bases, realizando

varios ciclos e incluso utilizando una etapa previa de calentamiento o empleando enzimas reparadoras, ha permitido salvar las dificultades del estudio de las muestras de ADN antiguo, generalmente pobres y a veces dañadas (Chou *et al.*, 1992; Rogan y Salvo, 1990). Se dispone también de recomendaciones precisas de distintos grupos de trabajo tanto en el ámbito de las Ciencias Forenses como de la Antropología Biológica, para el control de las contaminaciones, las cuales constituyen el problema esencial de la experimentación con ADN humano antiguo (Handt *et al.*, 1994, 1996; Richards *et al.*, 1995; Stoneking, 1995). Así, los equipos y reactivos empleados deben ser exclusivos para el estudio de ADN antiguo, el laboratorio debe encontrarse separado del laboratorio principal donde se analicen y almacenen productos post-PCR y ADN modernos, en cada extracción y en cada PCR se debe incluir un blanco sin ADN para verificar la no contaminación de los reactivos, todos los estudios deben confirmarse mediante múltiples extracciones y análisis independientes, etc.

La mayoría de las investigaciones con ADN antiguo llevadas a cabo hasta la fecha se han centrado en el estudio del ADN mitocondrial (ADNmt), especialmente en la denominada región control (Hagelberg y Clegg, 1993; Hagelberg *et al.*, 1994; Oota *et al.*, 1995; Oota *et al.*, 1999; Lalueza *et al.*, 1997). A diferencia del ADN nuclear, éste es circular, con unos 16500 pares de bases, de herencia materna, no recombina, tiene una tasa de mutación superior y se encuentra presente en cada célula en aproximadamente 1000 copias, lo cual incrementa considerablemente con respecto al ADN nuclear su probabilidad de conservación a través del tiempo.

EL ESTUDIO DE ADN MITOCONDRIAL DE PRIEGO

Nuestro trabajo pretende analizar algunos de los cambios evolutivos ocurridos en la población de Priego desde el medievo, pero también ser una contribución a la cuestión de los aportes poblacionales en la constitución de la variabilidad genética peninsular.

Las distintas oleadas venidas desde el norte de África a partir del siglo VIII constituyen sin duda un acontecimiento mayor en el establecimiento de esta variabilidad. Una de las más tardías en *Al-Andalus* tuvo lugar con la implantación en el S.XII del Imperio Almohade. Este episodio, bien definido y ampliamente recogido por la literatura histórica, refiriéndose a la presencia de miembros de este grupo étnico en el territorio peninsular, constituye en términos biológicos un punto clave de interpretación.

Madinat Baguh, hoy Priego de Córdoba, fue una de las ciudades que vivió su mayor momento de esplendor político, administrativo y económico en tiempos de los almohades (Carmona, 1997). Las fuentes históricas documentan que la población de Priego era entonces "étnicamente diversa" (Niéto, 1979) y que entre sus miembros se encontraban elementos almohades procedentes del Norte de África. La reconquista de la ciudad por Fernando III en 1225 supuso un cambio decisivo de la misma en múltiples aspectos, entre ellos la esperable alteración en la composición de la población. Dos siglos debieron transcurrir tras la reconquista para que la ciudad alcanzara aquellos límites de principios del siglo XIII. Por ello, la posibilidad de estudiar una muestra representativa de su población en la época del esplendor almohade y una muestra de la población que actualmente vive en Priego resulta de máximo interés para la documentación y descripción de esta contribución a la diversidad genética local.

MUESTRAS ESTUDIADAS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Las excavaciones arqueológicas llevadas a cabo entre 1995 y 2000 en Priego de Córdoba (Carmona y Luna, 1996; Carmona *et al.*, 1998; Carmona, 1999) permitieron recuperar restos humanos de tres zonas de necrópolis musulmana de época almohade: El Palenque, La Cava, y El Castillo. Su estado de conservación es muy bueno y la documentación arqueológica excelente. Los registros arqueológicos no dejan dudas acerca de la cultura y religión de estos individuos, pero, por supuesto, no informan de la composición biológica de la población.

Con el fin de determinar la composición genética de la población medieval, evaluar el impacto de las migraciones norteafricanas y los cambios evolutivos de la población hasta la actualidad, analizamos restos óseos y dentarios de 71 individuos medievales. También se recogieron 108 muestras de saliva de individuos voluntarios no emparentados de la población actual de Priego y sus aldeas, que dieron su consentimiento informado. El estudio consistió en el análisis de las secuencias de ADNmt de la primera región hipervariable (HVRI), en la región control, y polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP), de interés para descartar ambigüedades a la hora de adscribir las secuencias obtenidas a los denominados haplogrupos (grupos de secuencias que derivan de una secuencia ancestral común).



Lám. 1: Detalle de dos enterramientos islámicos de época almohade del yacimiento de El Palenque (Priego de Córdoba).

Los detalles relativos a la toma de muestras y metodología de análisis (técnicas de extracción de ADN, amplificación y secuenciación, análisis estadístico) se recogen en Casas et al. (aceptado, en prensa). Igualmente se detallan en dicho trabajo todas las precauciones y controles llevados a cabo con el fin de prevenir y, en su caso, detectar, posibles contaminaciones de las muestras antiguas con ADN exógeno.

El trabajo experimental con las muestras históricas se llevó a cabo en los laboratorios del departamento de genética de la Universidad de La Laguna y del CEES de la Universidad de Oslo, utilizando técnicas de extracción y amplificación distintas, que permitieron contrastar la coherencia de los resultados al analizar 10 muestras por duplicado. Los duplicados dieron resultados coincidentes y la eficiencia total fue de un 86%. Las muestras modernas fueron procesadas en la universidad de La Laguna.

Las muestras medieval y actual de Priego fueron comparadas entre sí, pero además utilizamos una amplia base de datos de HVRI de ADNmt de poblaciones actuales agrupadas en dos: la denominada Noroeste de África, que reúne datos de Argelia, Marruecos, Túnez, Sahara Occidental y Mauritania (Côrte-Real et al., 1996; Pinto et al., 1996; Rando et al., 1998; Brakez et al., 2001; Thomas et al., 2002; Plaza et al., 2003; Fadhloui-Zid et al., 2004) y Sur de la Península Ibérica, que incluye datos del Sur de Portugal y Andalucía (Côrte-Real et al., 1996; Pereira et al., 2000; Larruga et al., 2001; González et al., 2003; Plaza et al., 2003). Aquellas secuencias tanto de la población medieval como de la actual de Priego que no se han detectado hasta la fecha ni en el Noroeste de África ni en el Sur de la Península Ibérica fueron objeto de búsqueda en otras bases de datos de HVRI de ADNmt de poblaciones de amplias zonas geográficas: Península Ibérica e Islas Canarias, Madeira y Azores; Europa; Oriente Próximo; y África excepto el Noroeste. En Casas et al. (aceptado, en prensa) se detallan las poblaciones incluidas en ellas.

RESULTADOS

La diversidad de las secuencias detectada en ambas poblaciones, actual y medieval, de Priego fue similar, lo que confirma que el procedimiento de muestreo en la población medieval fue el adecuado para evitar repeticiones.

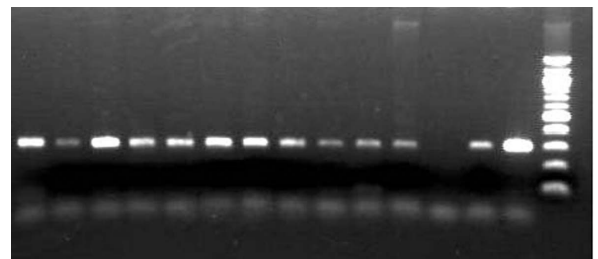
Entre los haplotipos (distintas secuencias de ADN) obtenidos encontramos que 7 de la población medieval y 7 de la actual no habían sido detectados nunca antes en ninguna población. Esto es un hallazgo no sorprendente, dada la alta variabilidad que presenta el fragmento estudiado HVRI en la población mundial. También encontramos que ambas poblaciones de Priego compartían 12 haplotipos, si bien no de manera exclusiva, puesto que todos ellos han sido detectados en poblaciones actuales de alguna otra área geográfica. Sin embargo, el hecho de que ambas poblaciones compartan algunos haplotipos que son poco frecuentes es un signo de una relativa continuidad genética de la población de Priego desde el medievo.

La mayoría de los linajes medievales (80%) y actuales (89%) de Priego son de origen euroasiático, pero la contribución africana resultó superior en la muestra histórica que en la actual. Además, cuando los haplotipos se reúnen en grupos con un origen común (haplogrupos) y se comparan sus frecuencias, destaca el hecho de que la más similar a la población Norteafricana es la de Priego medieval. El porcentaje de haplogrupos de origen africano era superior en Priego medieval que en la población actual de todo el Sur de la Península Ibérica y la de los linajes de origen africano subsahariano en Priego era significativamente superior en el me-

dievo que en la actualidad, lo que resulta coherente con los datos históricos acerca de la repoblación castellana de la región tras la reconquista cristiana.

PRESENCIA NORTEAFRICANA

Es un dato contrastado que entre las poblaciones europeas actuales, Iberia es la genéticamente más parecida a la población del Norte de África, y que entre ambas se ha detectado flujo genético, resultado de movimientos migratorios. Pero también es cierto que ambas muestran una clara diferenciación (Flores et al., 2000; Bosch et al., 2001), que nosotros también hemos detectado en nuestro estudio. Sin embargo, nuestros resultados indican que esas diferencias son mayores al comparar la población actual prieguense con la norteafricana, que al hacerlo entre la población que vivía en Priego en los siglos XII- XIII con ésta. Es cierto que, por el momento, carecemos de datos relativos a la composición genética de la población medieval norteafricana, pero este resultado parece poderse explicar de manera coherente por los movimientos migratorios desde el Norte de África durante la dominación musulmana en la Península Ibérica y las migraciones posteriores en sentido inverso. Más aún, tal y como apuntamos, el número significativamente superior de linajes subsaharianos en Priego medieval, dos de los cuales también se han encontrado en el Noroeste de África, apoyan también la explicación de que su presencia en la Península Ibérica se debe a la inmigración de población norteafricana en el medievo. De hecho los registros históricos (Carmona, 1997), recogen los importantes movimientos poblacionales desde y hacia Priego de Córdoba que ocurrieron entre los siglos XIII y XVII, por causas políticas, tales como la revuelta de los mudéjares (población islámica) y su desplazamiento al Sur mientras se animaba la repoblación castellana durante el s. XIII, la definitiva reconquista por los cristianos en el s. XIV, la inestabilidad de las fronteras en los territorios que quedaron aún bajo dominio islámico durante los siglos XIV y XV, la conversión forzosa o expulsión de los mudéjares en 1502 y la ex-



Lám. 2: Gel de agarosa de los productos amplificados por PCR de un fragmento de 278 pares de bases de la región HVI del ADN mitocondrial, analizado en las muestras medievales de Priego. La línea horizontal de bandas luminosas corresponde a los productos amplificados. Cada banda es una muestra de un individuo diferente y la intensidad de la luminosidad se relaciona con la cantidad de ADN. A la derecha se muestra una escala de referencia de tamaños de fragmentos de ADN, de manera que las bandas de productos amplificados se sitúan a la altura de la tercera banda de la escala de referencia, que es la de un fragmento de ADN de 300 pares de bases. La ausencia de banda en el tercer lugar de la derecha después de la escala corresponde a un control negativo de PCR (sin muestra de ADN), que no muestra amplificación.

· CAATCAACCCCTCAAC TA T CACA CA T CAAC TG CAAC TC
 40 50 60 70

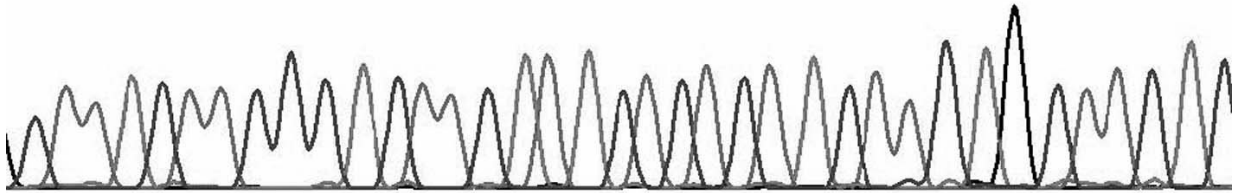


Fig. 1: Gráfico correspondiente a parte de la secuencia de uno de los fragmentos analizados de la región HVI del ADN mitocondrial en una de las muestras medievales de Priego. Una vez amplificado, el fragmento de ADN es secuenciado, es decir se lee la sucesión de bases nitrogenadas (A,C,T,G) que lo componen. Este gráfico se construye con cuatro curvas, una por cada base, representadas aquí de un color distinto. Los picos de cada curva se sitúan en el lugar de la secuencia de ADN coincidente con la posición de la base correspondiente. En la parte superior de la figura aparece la lectura de la secuencia.

pulsión definitiva de los moriscos en 1611. Como resultado, la población actual resulta más divergente de la norteafricana que la de época almohade.

Un dato curioso es que encontramos linajes africanos del denominado haplogrupo L3 sólo en la población actual de Priego y en poblaciones bereberes de Túnez, y no en ninguna otra de las poblaciones consideradas en nuestras comparaciones. La explicación más plausible, pues, es que esos linajes llegaron a Priego en época más reciente, y en ausencia de otros datos, desde dicho país.

UNA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN A EXPLORAR EN PROFUNDIDAD

Hemos visto cómo un estudio poblacional con ADN antiguo puede contribuir a comprender mejor la composición genética de las poblaciones humanas actuales y los cambios ocurridos en el tiempo, confirmando o refutando hipótesis trazadas a partir de información de las fuentes históricas o arqueológicas. Nuestra experiencia con este trabajo nos ha permitido poner de manifiesto el enorme interés de combinar datos genéticos procedentes de distintas épocas para intuir el impacto que las distintas migraciones humanas han tenido en la estructura genética de las poblaciones actuales. El éxito de nuestro trabajo permite ser optimistas en cuanto a la posibilidad de continuar esta línea de investigación con muestras humanas de otras cronologías, en especial de aquellas de las que se carece de información por fuentes escritas. En este sentido la riqueza arqueológica de Priego de Córdoba y su entorno constituye un patrimonio de enorme interés para ser explorado con fines científicos.

Agradecimientos:

Este trabajo ha sido posible gracias a Rafael Carmona y Emmanuel Cleuvenot, que contribuyeron a la documentación arqueológica y antropológica de los restos medievales. El Museo Histórico Municipal y la DGBBCC de la Junta de Andalucía autorizaron el acceso a las muestras antiguas. La colaboración de

Antonio Alcalá y su equipo, así como la generosidad de todos los donantes voluntarios, permitieron la recogida de las muestras de población actual. Esta investigación fue llevada a cabo en colaboración con los equipos de ADN antiguo de las Universidades de Oslo y La Laguna y fue financiada mediante una beca del Ministerio de Educación (2002 EX 9/30/02) a la autora, el CEES de la Universidad de Oslo y las becas BMC2001-3511 del Ministerio de Ciencia y Tecnología y COF2002-015 del Gobierno de Canarias a VMCabrera.

BIBLIOGRAFÍA

- Bosch E, Calafell F, Comas E, Oefner PJ y Bertranpetit J. (2001): "High-resolution analysis of human Y-chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited gene flow between northwestern Africa and the Iberian Peninsula". *Am J Hum Genet.* 68:1019-1029.
- Brakez Z, Bosch E, Izaabel H, Akhayat O, Comas E, Bertranpetit J y Calafell F. (2001): "Human mitochondrial DNA sequence variation in the Moroccan population of the Souss area". *Ann Hum Biol* 28:295-307.
- Cano RJ, Poinar HN. (1993): "Rapid isolation of DNA from fossil and museum specimens suitable for PCR". *Biotechniques* 15: 432-436.
- Carmona R. (1997): "Edad Media". En Ropero M, Moreno B, Gómez J, Moreno A, Carmona R, Durán F, Forcada M, Jiménez M, Campos M. **Priego de Córdoba. Guía multidisciplinar de la ciudad y su territorio.** Priego de Córdoba: Museo Histórico Municipal de Priego de Córdoba p 121-149.
- Carmona R. (1999): "La necrópolis medieval islámica de El Palenque": confirmación arqueológica y datación. *Antiquitas* 10:238-239.
- Carmona R y Luna D. (1996): "La necrópolis y los arrabales hispanomusulmanes de La Cava: primeros resultados de una excavación arqueológica de urgencia en Madinat Bāguh (Priego de Córdoba)". *Antiquitas* 7:115-134.
- Carmona R, Moreno A y Luna D. (1998): "Excavaciones arqueológicas en el Castillo de Priego. Informe de la intervención arqueológica de urgencia de 1997". *Antiquitas* 9:101-128.
- Casas MJ, Hagelberg E, Fregel R, González AM y Larruga JM. "Human mitochondrial DNA diversity in an archaeological site in *al-Andalus*. Genetic impact of migrations from North Africa in medieval Spain". *Am J Phys Anthropol.* (aceptado en prensa).
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. (1992): "Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization

improves low copy number amplifications". **Nucleic Acids Res** 20: 1717-1723.

Côrte-Real HB, Macaulay VA, Richards MB, Hariti G, Issad MS, Cambon-Thomsen A, Papiha S, Bertranpetit J, y Sykes BC. (1996): "Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis". **Ann Hum Genet** 60:331-350.

Fadhlaoui-Zid K, Plaza S, Calafell F, Ben Amor M, Comas D y Bennamar El gaalel A. (2004): "Mitochondrial DNA heterogeneity in Tunisian Berbers". **Ann Hum Genet** 68:222-233.

Flores C, Hernández M, González AM y Cabrera VM. (2000): "Genetic affinities among human populations inhabiting the Subsaharian area, Northwest Africa, and the Iberian Peninsula". In Arnáiz Villena A, editor. **Prehistoric Iberia: Genetics, Anthropology and Linguistics**. New York: Plenum: 33-50.

González AM, Brehm A, Pérez JA, Maca-Meyer N, Flores C y Cabrera VM. (2003): "Mitochondrial DNA affinities at the Atlantic fringe of Europe". **Am J Phys Anthropol** 120:391-404.

Hagelberg E, Clegg JB. (1991): "Isolation and characterization of DNA from archaeological bone". **Proc R Soc Lond Biol Sci** 244: 45-50.

Hagelberg E, Clegg JB. (1993): "Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific Islanders determined by analysis of ancient bone DNA". **Proc R Soc Lond Biol Sci** 252: 163-170.

Hagelberg E, Quevedo S, Turbon D, Clegg JB. (1994): "DNA from ancient Easter Islanders". **Nature** 369: 25-26.

Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. (1989): "Ancient bone DNA amplified". **Nature** 342: 485.

Handt O, Höss M, Krings M, Pääbo S. (1994): "Ancient DNA: methodological challenges". **Experientia** 50: 524-529.

Handt O, Krings M, Ward RH, Pääbo S. (1996): "The retrieval of ancient human DNA sequences". **Am J Hum Genet** 59: 368-376.

Höss M, Pääbo S. (1993): "DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method". **Nucleic Acids Res** 21: 3913-3914.

Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S. (1997): "Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans". **Cell** 90: 19-30.

Lalueza C, Pérez-Pérez A, Prats E, Coroudella L, Turbón D. (1997): "Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia". **Hum Mol Genet** 6: 41-46.

Larruga JM, Díez F, Pinto FM, Flores C y González AM. (2001): "Mitochondrial DNA characterization of European isolates: the Maragatos from Spain". **Eur J Hum Genet** 9:708-716.

Nieto Cumplido M. (1979): **Corpus mediaeval Cordubense**, I (1106-1255), II (1256-1277). Córdoba.

Oota H, Saitou N, Matsushita T, Ueda S. (1995): "A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences". **Am J Phys Anthropol** 98: 133-145.

Oota H, Saitou N, Matsushita T, Ueda S. (1999): "Molecular genetic analysis of remains of a 2,000-year-old human population in China and its relevance for the origin of the modern Japanese population". **Am J Hum Genet** 64: 250-258.

Pereira L, Prata MJ y Amorim A. (2000): "Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation". **Ann Hum Genet** 64:491-506.

Pinto F, González AM, Hernández M, Larruga JM y Cabrera VM. (1996): "Spanish ancestors inferred from mitochondrial DNA sequences". **Ann Hum Genet** 60:321-330.

Plaza S, Calafell F, Helal A, Bouzerna N, Lefranc G, Bertranpetit J y Comas D. (2003): "Joining the pillars of Hercules: mtDNA sequences show multidirectional gene flow in the western Mediterranean". **Ann Hum Genet** 67:312-328.

Rando JC, Pinto F, González AM, Hernández M, Larruga JM, Cabrera VM y Bandelt HJ. (1998): "Mitochondrial DNA analysis of northwest African populations reveals genetic exchanges with European, near-eastern, and sub-Saharan populations". **Ann Hum Genet** 62:531-550.

Richards MB, Sykes BC, Hedges REM. (1995): "Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains". **J Archaeol Sci** 22: 291-299.

Rogan PK, Salvo JJ. (1990): "Molecular genetics of pre-Columbian South American mummies". **UCLA Symposium in Molecular Evolution** pp. 223-224.

Stoneking M. (1995): "Ancient DNA: how do you know when you have it and what can you do with it?" **Am J Hum Genet** 57: 1259-1262.

Thomas MG, Weale ME, Jones AL, Richards M, Smith A, Redhead N, Torroni A, Scozzari R, Gratix F, Tarekegn A, Wilson J F, Capelli C, Bradman N y Goldstein DB. (2002): "Founding mothers of Jewish communities: geographically separated Jewish groups were independently founded by very few female ancestors". **Am J Hum Genet** 70:1411-1420

Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dudar JC, Saunders SR. (1998): "Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns". **Am J Phys Anthropol** 105: 539-543.

Yang H, Golenberg EM, Shoshani J. (1997): "Proboscidean DNA from museum and fossil specimens: an assessment of ancient DNA extraction and amplification techniques". **Biochem Genet** 35: 165-179.

