

*Originalni članci/
Original articles*

VARIJABILNOST MIKROSATELITSKIH
MARKERA X HROMOZOMA I NJIHOVA
PRIMENA U FORENZICI

GENETIC VARIABILITY OF
X CHROMOSOME MICROSATELLITE
MARKERS IN FORENSIC ANALYSIS

Correspondence to:

Doc. dr **Dušan Vapa**

Univerzitet u Novom Sadu
Medicinski fakultet, Katedra za sudsku
medicinu,
Hajduk Veljkova 3,
21 000 Novi Sad

e-mail: dusan.vapa@mf.uns.ac.rs

Dušan Vapa¹, Igor Veselinović¹, Radosav Radosavkić¹,
Nevena Veličković², Milan Popović³

¹ Katedra za sudsku medicinu, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski
fakultet,

² Departman za biologiju i ekologiju, Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet,

³ Katedra za histologiju i embriologiju, Univerzitet u Novom Sadu,
Medicinski Fakultet

Ključne reči

DNK; Mikrosatelitski markeri; X-STR;
sudska medicina; forenzička genetika

Key words

X-Chromosome STRs; Argus X-12;
Population data; Forensic genetics;
Microsatellite repeats; Serbian population.

Sažetak

Kratki uzastopni ponovci predstavljaju klasu mikrosatelitskih segmenata DNK, rasprostranjenih širom genoma čoveka. Građeni su od uzastopno ponavljajućih sekvenci dužine 2-6 parova nukleotida. Zahvaljujući različitom broju ponavljanja repetitivne jedinice, većina mikrosatelitskih markera pokazuje visok stepen polimorfizma dužine, koji je moguće ispitati primenom tehnike lančane reakcije polimeraze. Pored utvrđivanja spornih srodničkih odnosa, analiza X hromozom mikrosatelitskih markera može se uspešno koristiti i u oblastima kriminalistike, humane identifikacije, populaciono-genetičkim i demografskim istraživanjima i dr. Cilj našeg istraživanja bila je izrada populacione studije, iz koje će se izračunati broj i frekvencija alela, struktura i frekvencija haplotipova, utvrditi vrednosti relevantnih statističkih parametara, i oceniti mogućnost primene analize X-STR markera u slučajevima iz oblasti medicinske kriminalistike, humane identifikacije i veštačenja spornih srodničkih odnosa u populaciji Vojvodine. Istraživanje je izvršeno u Centru za sudsku medicinu, toksikologiju i molekularnu genetiku, u Novom Sadu, u vidu prospektivne studije, na uzorku od 200 odraslih, međusobno nesrodnih osoba, oba pola. Izolacija DNK vršena je *Chelex* metodom, amplifikacija dobijenih uzoraka vršena je metodom PCR, uz korišćenje komercijalnog *Mentype® Argus X-8 PCR Amplification Kit-a*. Razdvajanje dobijenih fragmenata izvršeno je kapilarnom elektroforezom na aparatu *ABI Prism 310 Genetic Analyzer*. Za interpretaciju dobijenih rezultata korišten je *GeneScan* i *Genotyper* program, a za statističke analize programi *Arlequin* i *GENEPOP*. Dobijeni rezultati ukazuju da se ova metoda može uspešno primeniti u oblastima medicinske kriminalistike, humane identifikacije i veštačenja spornih srodničkih odnosa, a ujedno predstavljaju i bazu podataka za dalja istraživanja.

UVOD

Analiza DNK u oblastima identifikacije primenjuje se od kraja osamdesetih godina prošlog veka. Mogućnost njene primene zasniva se na pretpostavci da ne postoje dve osobe sa istim DNK profilom, osim jednojajčanih blizanaca. Da bi ova tvrdnja postala i nepobitna činjenica, bilo bi neophodno analizirati DNK profile čitave svetske populacije i na taj način potvrditi da zaista ne postoje dva ista genetska profila. S obzirom na to da je takav zadatak praktično nemoguće

izvršiti, vrši se utvrđivanje stepena verovatnoće da je određena (osumnjičena) osoba ostavila biološki trag, odnosno da to nije učinila neka druga osoba. Ukoliko se DNK profil biološkog traga izuzetog sa lica mesta, poklapa sa DNK profilom ispitivane osobe, prelazi se na izračunavanje moći diskriminacije za svaki lokus (marker), a na osnovu broja lokusa korišćenog komercijalnog kita, dolazi se do ukupne vrednosti moći diskriminacije. Broj dobijen preračunom, predstavljajući verovatnoću, iskazanu u procentima, da dve nesrodne, slučajno odabrane osobe, imaju identičan profil.

Interesovanje za markere smeštene na X hromozomu povećano je u poslednjih nekoliko godina, uglavnom iz razloga što predstavljaju kombinaciju poželjnih osobina drugih uobičajeno korištenih genetičkih markera. Kako autozomi, tako i X hromozom podleže rekombinaciji, a slično mitohondrijskoj DNK i Y hromozomu, ima polno vezan način nasleđivanja i omogućuje izradu haplotipova (samo kod muških osoba).

Ukoliko je neophodno utvrditi oca ženskog deteta, pri čemu je otac nedostupan za uzimanje uzorka, zahvaljujući analizi X-STR markera, moguće je iskoristiti uzorak uzet od majke nedostupnog oca, jer će se analiziranjem majčinog DNK profila moći sagledati i aleli koje je njen sin (a istovremeno potencijalni otac) nasledio. Upravo u ovakvim situacijama tzv. deficijentnim slučajevima, analiza markera vezanih za X hromozom predstavlja najjači forenzički adut. U slučaju da oba roditelja nisu dostupna za uzimanje uzorka, analizom X-STR markera uzoraka uzetih od sestara, koje nasleđuju X hromozom od svog oca, a samim tim i identične alele sa njegovog hromozoma, moguće je isključiti mušku osobu kao njihovog potencijalnog oca. Analizom autozomalnih markera sestara, isključivanje potencijalnog oca, ne bi bilo moguće izvršiti.

Moć diskriminacije mikrosatelitskih markera X hromozoma, u mnogome zavisi od pola osobe, čiji se tragovi analiziraju. Ovi markeri, pokazali su se kao bolji, a ujedno i efikasniji od analize autozomalnih markera, prilikom analize mešovitih tragova, u kojima je potrebno izdvojiti DNK profil ženske osobe, iz mešovitog traga u kojem dominira DNK profil muške osobe. Njihova prednost, u pomenutoj situaciji, ogleda se u tome što se aleli ženske osobe mogu kompletno poklopiti sa DNK profilom muške osobe, samo u slučaju da je ta ženska osoba homozigot za sve lokuse, što je, u praksi, gotovo nemoguće. Prema tome, najveći značaj i praktična primena X-STR markera podrazumevala bi situacije u kojima je neophodno identifikovati žensku osobu (npr. žrtvu silovanja), iz ćelija njene kože nađene ispod noktiju muške osobe (osumnjičenog) ili iz uzorka vaginalnih ćelija izuzetih sa njegovog polnog uda.

Svaki alel, u sklopu određenog markera koji se koristi u forenzici, nalazi se u određenoj frekvenciji unutar populacije, odnosno poseduje određenu učestalost. Ono što je važno, jeste utvrditi kolika je njegova učestalost u populaciji, a samim tim kolika je moć tog markera u povezivanju dva DNK profila koji se porede (biološki trag - osumnjičeni, dve srodne osobe i dr.). Ukoliko se alel nalazi u populaciji u učestalosti od 50% (poseduje ga svaka druga osoba), tada podatak da biološki trag i osumnjičena osoba imaju isti marker neće biti od velike koristi. Međutim, ukoliko se u određenoj populaciji taj alel nalazi kao jedan u milion osoba, takva informacija može biti od velike koristi.

Utvrdivanjem broja i frekvencije alela, unutar i između populacija, može se doći do informacija o njihovoj strukturi, rastu, veličini i starosti.⁽¹⁾ Pored utvrđivanja frekvencije alela, važno je ustanoviti da li postoje genetičke substrukture unutar populacije, kao i genetičke varijacije između populacija. Jedna od najčešćih metoda kojom se utvrđuju pomenuti elementi, predstavlja metoda F statistike (Fst), koja ima direktan odnos sa varijansom frekvencije alela unutar populacije, kao i između njih.⁽²⁾ Manje Fst vrednosti

ukazuju na nisku genetičku diferencijaciju poređenih struktura unutar ili među populacijama, i obrnuto. Razlog za kreiranje jedne ovakve baze podataka, koja bi sadržala varijante alela na ispitivanim lokusima, leži u činjenici da se svi forenzički statistički parametri procenjuju upravo na osnovu frekvencija tih alela, u datoj populaciji. Prema tome, da bi se dobili precizni rezultati, neosporni u sudskim procesima, neophodno je utvrditi genetički diverzitet lokalne populacije. U naučnim časopisima, vezanim za oblast populacionih studija, mogu se pronaći brojni radovi u kojima se objavljuju podaci o distribuciji i frekvenciji alela, za veliki broj populacija, rasprostranjenih širom sveta. Olakšan pristup takvim podacima, omogućava vršenje uporednih analiza rezultata ispitivane populacije, sa rezultatima ranije istraženih populacija, utvrđivanje eventualnih statistički značajnih razlika između populacija, preciznije izračunavanje forenzičkih statističkih parametara, kao i ocene mogućnosti praktične primene ove metode u datom regionu. U forenzičkoj primeni je naročito važno uočiti eventualne substrukture unutar populacije (npr. razlika između frekvencije alela između muškaraca i žena), i uzeti ih u obzir prilikom tumačenja snage dokaza dobijenog DNK profila.⁽³⁾

Dakle, kako bi analiza X-STR markera mogla biti praktično primenjena na našoj teritoriji, bilo je potrebno najpre napraviti populacionu studiju, u kojoj će biti utvrđeni broj i frekvencije alela na svakom od analiziranih lokusa. Na osnovu tih podataka izračunali bi se neophodni opšti i forenzički statistički parametri, a nakon toga i izvršilo poređenje sa rezultatima drugih studija. Napominjemo da je ovo prvo istraživanje i prva populaciona studija mikrosatelitskih markera, smeštenih na X hromozomu, u našoj zemlji.

MATERIJAL I METODE

Istraživanje je izvršeno u Centru za sudsku medicinu, toksikologiju i molekularnu genetiku, u Novom Sadu, u vidu prospektivne studije. Uzorci venske krvi, uzeti su od 200 odraslih, međusobno nesrodnih osoba, oba pola (175 muškaraca i 25 žena), obdukovanih u Centru za sudsku medicinu, toksikologiju i kliničku genetiku u Novom Sadu. Trajne krvne mrlje, načinjene su na FTA-karticama (impregnirana hartija na kojoj se lizira membrana ćelije, a DNK vezuje za matriks hartije). Izolacija DNK materijala iz krvnih mrlja vršena je Chelex metodom,⁽⁴⁾ prema standardnom protokolu. Amplifikacija dobijenih uzoraka DNK, vršena je metodom PCR, uz korišćenje komercijalnog *Mentype® Argus X-8 PCR Amplification Kit-a*, proizvođača *Biotype AG, Dresden, Germany*, prema uputstvu proizvođača.⁽⁵⁾ Razdvajanje dobijenih fragmenata izvodi se kapilarnom elektroforezom na aparatu ABI Prism 310 Genetic Analyzer, korišćenjem *ABI Prism 310 Data Collection* softvera. Za interpretaciju dobijenih rezultata korišten je *GeneScan* i *Genotyper* program, sa 3.7 verzijom softvera.

Nakon detekcije i razvrstavanja dobijenih rezultata, odnosno DNK profila, izvršeno je izračunavanje opštih genetičkih, statističkih parametara. Utvrđivanje frekvencije alela izvršeno je pomoću programa *Arlequin* verzije 3.5 i *GENEPOP* verzije 4.2. Exact testom je provereno da li među lokusima postoji pojava *linkage disequilibrium-a*. Za uzorak ženskog dela populacije izvršena je provera da li se populacija nalazi u *Hardy-Weinberg*-ovoj ravnoteži.

Tabela 1. Zbirna tabela frekvencija alela i forenzičkih statističkih parametara

	DXS8378	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135	DXS7423	HPRTB
7				0,0711				
8				0,1778				0,0089
9	0,0356			0,0044				0,0133
10	0,3644			0,0044				0,0311
11	0,3467	0,0089						0,1111
12	0,2044	0,0533						0,3111
13	0,0489	0,2667		0,0044			0,1022	0,3244
14		0,3822		0,0133			0,3156	0,1422
15		0,2444		0,0756			0,3867	0,0533
16		0,0356		0,1733		0,0089	0,1778	
16.2				0,0311				
17		0,0089		0,2222		0,0311	0,0178	0,0044
18				0,1422		0,0267		
19				0,0622		0,0800		
20				0,0178		0,0978		
21						0,0933		
21.1						0,0044		
22						0,1556		
23						0,0800		
24					0,0044	0,0622		
24.2					0,0044			
25						0,1022		
26						0,0578		
26.2					0,0133			
27					0,0044	0,0578		
27.2					0,0533			
28					0,0222	0,0533		
28.2					0,1200			
29					0,0133	0,0400		
29.2					0,1289			
30					0,0489	0,0133		
30.2					0,1867			
31			0,0222		0,0800	0,0222		
31.2					0,1111			
32			0,0178		0,0844	0,0044		
32.2					0,0578			
33			0,0622		0,0400			
33.2					0,0044			
34			0,1511		0,0133	0,0089		
35			0,2489		0,0089			
36			0,1867					
37			0,1422					
37.2			0,0044					
38			0,0489					
38.2			0,0044					
39.3			0,0044					
40.3			0,0089					
42.3			0,0044					
PIC	0,6463	0,6697	0,8373	0,8357	0,8882	0,9108	0,6570	0,7254
HET	0,7016	0,7188	0,8529	0,8526	0,8969	0,9167	0,7085	0,7613
PE	0,4307	0,4579	0,7006	0,7000	0,7891	0,8297	0,4416	0,5294
PI	0,1492	0,1406	0,0735	0,0737	0,0515	0,0416	0,1457	0,1193
PDF	0,8557	0,8718	0,9627	0,9614	0,9807	0,9871	0,8635	0,9071
PDM	0,7016	0,7188	0,8529	0,8526	0,8969	0,9167	0,7085	0,7613
MECKRU	0,4445	0,4734	0,6094	0,7055	0,7928	0,8317	0,4579	0,5486
MECKIS	0,6463	0,6697	0,7327	0,8355	0,8879	0,9107	0,6570	0,7252
MECDES	0,6463	0,6697	0,8373	0,8357	0,8882	0,9108	0,6570	0,7254
MECDES DUO	0,5019	0,5272	0,7344	0,7309	0,8072	0,8420	0,5130	0,5913

Matematičke formule za *Exact test* i *Hardy-Weinberg*-ovu ravnotežu nalaze se u sklopu *Arlequin* programa, tako da su ovim programom i izvršene pomenute statističke analize.

Nakon izračunavanja opštih genetičkih, statističkih parametara, izračunati su i sledeći forenzički statistički parametri:

- *Polymorphism information content* (PIC) - parametar koji pokazuje koliko je određeni marker polimorfan, odnosno informativan, a čije vrednosti rastu sa povećanjem broja alela na lokusu i njihovim ujednačenijim frekvencijama.

- Stepent heterozigotnosti (HET) predstavlja procenat heterozigotnih osoba - veći stepent heterozigotnosti rezultuje većom varijabilnošću.

- *Power of exclusion* (PE), odnosno moć isključivanja - verovatnoća da će muška osoba koja nije biološki otac deteta biti isključen na osnovu rezultata za određeni lokus.

- *Paternity index* (PI), odnosno index očinstva - verovatnoća da je ispitana muška osoba biološki otac deteta u odnosu na mušku osobu, izabranu metodom slučajnog izbora.

- *Power of discrimination of man and female* (PDM i PDF), odnosno moć diskriminacije za muške i ženske osobe - verovatnoća da će dve osobe, izabrane metodom slučajnog izbora, imati različit genotip na određenom lokusu.

- *Mean exclusion chance* (MEC), odnosno prosečna vrednost isključivanja - verovatnoća da će dve osobe, izabrane metodom slučajnog izbora, imati identičan genotip na određenom lokusu.

Pomenuti parametri, izračunati su korišćenjem statističkog programa i formula, dostupnim za slobodnu upotrebu na stranici odgovarajućeg sajta (www.chrx-str.org) koji se bavi istraživanjem X-STR markera.⁽⁶⁻¹⁰⁾

Za vizuelizaciju interpopulacionih genetičkih odnosa, pomoću programa POPTREE2, konstruisani su dendrogrami.⁽¹¹⁾ Kao ulazni parametar u konstruisanju dendrograma, uzete su izračunate *Fst* vrednosti genetičke diferencijacije.⁽¹²⁾ Dobijene vrednosti genetičke diferencijacije iskorištene su i implementirane i u koordinatnu analizu (*Principal Coordinate Analysis - PCoA*) programskog paketa GenAlEx 6.5.⁽¹³⁾

REZULTATI

Rezultati dosadašnjih ispitivanja ukazuju na to, da lokus koji je manje informativan u jednoj populaciji, u drugoj populaciji može biti mnogo značajniji i informativniji. Upravo zbog toga je neophodno utvrditi frekvenciju alela za svaki lokus, u svakoj populaciji, da bi, na osnovu dobijenih podataka populacionih studija, bilo moguće izračunati forenzičke parametre, a potom ih i koristiti na određenoj teritoriji. Stepent polimorfizma, odnosno informativnost određenog markera, zavisi od broja alela prisutnih na lokusu, kao i od

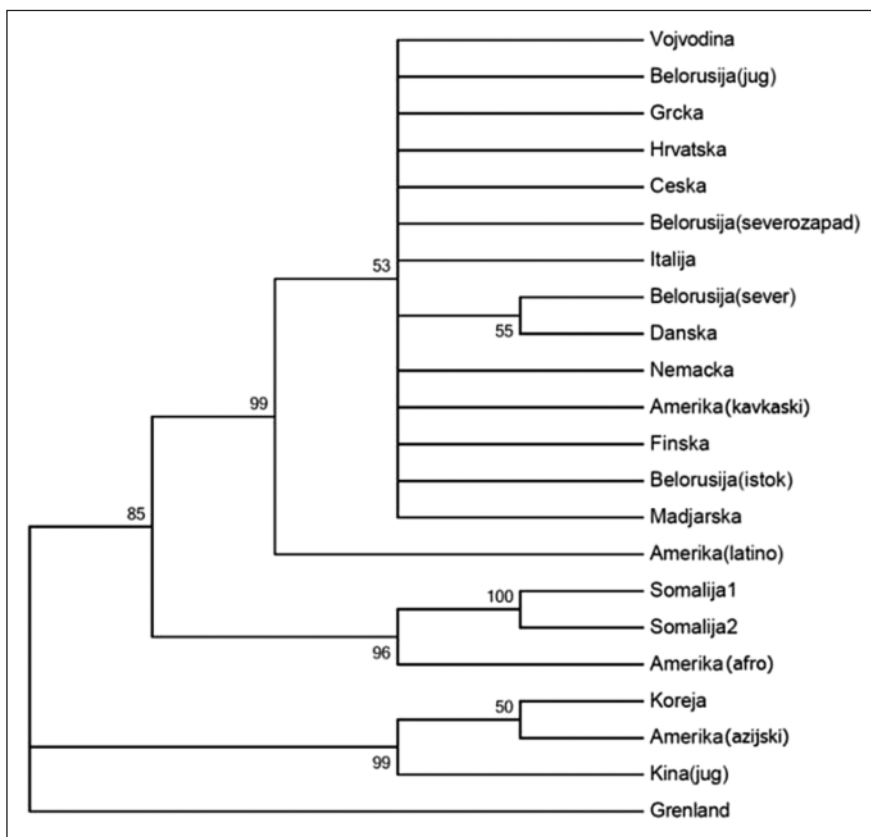
načina na koji su ti aleli raspoređeni. U našem istraživanju, najveći broj alela, ukupno 19, pronađen je na lokusu DXS10135, koji ujedno predstavlja i najinformativniji marker među ispitivanim. Najniži stepent polimorfizma pokazao je lokus DXS8378 (Tabela 1).

U posmatranom uzorku populacije Vojvodine, za ispitivane lokuse, stepent polimorfizma kreće se u rasponu 0,6463-0,9108, heterozigotnost 70,16-91,67%, moć isključivanja 43,07-82,97%, moć diskriminacije za ženske osobe 85,57-98,71%, a za muške osobe 70,16-91,67% (Tabela 1).

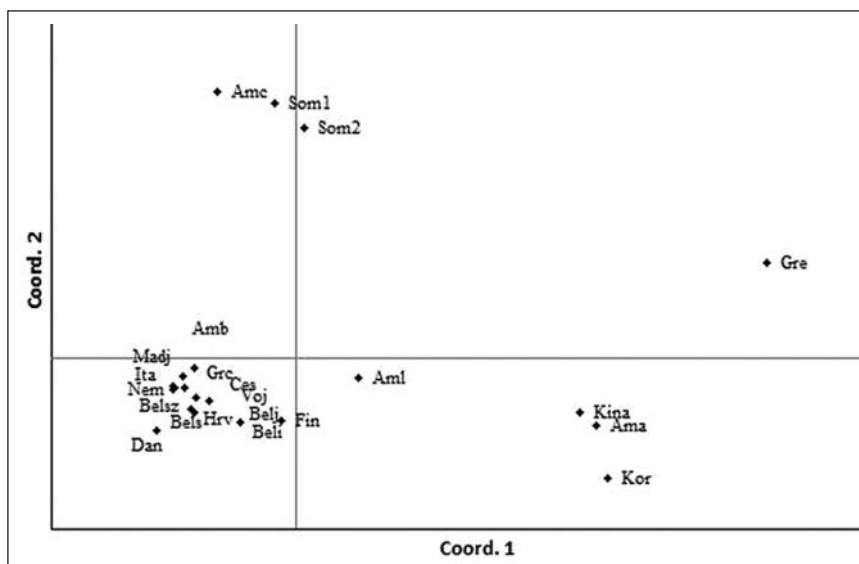
DISKUSIJA

Osim brojnih istraživanja koja su vršena u zemljama našeg kontinenta, slične populacione studije rađene su i širom sveta.⁽¹⁴⁻¹⁹⁾ Ono što je zajedničko i što se navodi u zaključcima svih navedenih objavljenih radova, jeste to, da X-STR markeri ispunjavaju postavljene kriterijume o stepenu polimorfizma, heterozigotnosti, moći diskriminacije i isključivanja, te da je njihova samostalna primena ili primena u vidu dodatne metode, uz analizu drugih markera, u potpunosti opravdana.

Poređenjem pojedinačnih lokusa populacije Vojvodine i Hrvatske,⁽²⁰⁾ pomoću *exact* testa, ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika u frekvenciji alela. Ovo je, donekle, i očekivano, imajući u vidu *Fst* vrednosti od 0,001 između ovih populacija. Za vrednosti ispod 0,05 smatra se da ukazuju na nisku genetičku diferencijaciju između dve populacije, tako da dobijena vrednost ukazuje na veoma nisku genetičku diferencijaciju između populacija Vojvodine i Hrvatske.



Slika 1. Dendrogram konstruisan po UPGMA metodi za populacije analizirane PCR kitom Mentype Argus X-8



Slika 2. PCoA konstruisan za populacije analizirane PCR kitom *Mentype Argus X-8*
 *Skrraćeni nazivi populacija: Voj-Vojvodina, Hrv-Hrvatska,(20) Kor-Južna Koreja,(14) Fin-Finska,(15) Som1-Somalija,(15) Nem-Nemačka,(22) Ita-Italija,(23) Bels/Belsz/Beli/Belj-Belorusija (sever/severozapad/istok/jug),(24) Madj-Mađarska,(25) Kin-Kina,(16) Amc/Ama/Amb/Aml-Amerika afroamerikanci/azijski/kavkaski/latino,(17) Ces-Češka,(26) Gre-Grenland,(21) Dan-Danska,(21) Som2-Somalija,(21) Grc-Grčka.(27)

Razlike u distribuciji i frekvencijama alela, a time i genetička bliskost, odnosno udaljenost između populacija, prikazana je vrednostima Fst. Na osnovu dobijenih Fst vrednosti, konstruisani su dendrogrami i koordinatni sistemi (Slike 1 i 2), koji na jednostavan, vizuelan način prikazuju odnose između populacija. Ono što je na prvi pogled najuočljivije, to je da postoji grupisanje evropskih populacija, što ukazuje na njihovu genetičku bliskost. U grupu sa evropskim populacijama spada i populacija kavkaskih Amerikanaca. Nešto genetički izdvojenija od ostalih evropskih populacija jeste populacija Danske, ali, istovremeno, ona pokazuje više genetičke bliskosti sa populacijom severnog dela Belorusije u odnosu na ostale evropske populacije. Populaciji Latinoamerikanaca pripada posebna grupa, koja je, opet, bliža evropskim populacijama, u odnosu na populacije Afrike i Azije. Afroamerikanci i dve analizirane populacije Somalije svrstane su u istu grupu na osnovu genetičke bliskosti, a takođe i populacije Kine, Južne Koreje i azijski Amerikanci, s tim što, unutar ove grupe, pojedini vizuelni prikazi pokazuju veću bliskost između populacija Koreje i azijske Amerike (Slika 1), a drugi između Kine i azijske Amerike (Slika 2). Populacija Grenlanda predstavlja genetički najudaljeniju populaciju od svih analiziranih, i

svrstana je u posebnu grupu. Najveća genetička diferencijacija, u ovom istraživanju, upravo je i zabeležena između populacije Grenlanda i Afroamerikanaca, a Fst vrednost iznosila je 0,062, što predstavlja srednji nivo diferencijacije između populacija. Presentovana poređenja između populacija u skladu su sa rezultatima drugih istraživanja, gde je takođe najveću genetičku diferencijaciju pokazala populacija Grenlanda, u odnosu na drugih 13 ispitivanih populacija.⁽²¹⁾

ZAKLJUČAK

Proučavanjem varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa X hromozoma, izrađena je populaciona studija, iz koje je moguće odrediti broj i frekvenciju alela na svakom od 8 ispitivanih lokusa, u populaciji Vojvodine. Broj alela na ispitivanim lokusima kreće se između 5 i 19. Locus sa najvećim brojem alela je DXS10135, a dva lokusa sa najmanjim brojem alela su DXS8378 i DXS7423. Za ispitivane lokuse, stepen polimorfizma kreće se u rasponu od 0,6463 do 0,9108. Najveći stepen polimorfizma pokazao je locus DXS10135, dok je najmanje informativan locus DXS8378. Na osnovu dobijenih rezultata i izračunatih forenzičkih statističkih parametara, može se zaključiti da se analiza ispitivanih X-STR markera može uspešno primeniti u praksi, u slučajevima iz oblasti medicinske kriminalistike, humane identifikacije i veštačenja spornih srodničkih odnosa u populaciji Vojvodine. Poređenjem sa podacima populacione studije iz Hrvatske, uočava se sličnost u rasporedu i frekvencijama alela po lokusima, pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između populacija Hrvatske i Vojvodine. Poređenje populacija, na osnovu izračunatih Fst vrednosti, ukazuje na nisku genetičku diferencijaciju između populacije Vojvodine i drugih evropskih populacija. Najveću genetičku udaljenost, koja ujedno predstavlja srednji stepen genetičke diferencijacije, u odnosu na populaciju Vojvodine, pokazala je populacija Grenlanda. Rezultati sprovedene populacione studije mogu poslužiti kao osnov i baza podataka za dalja istraživanja u populaciono-genetičkim, antropološkim, demografskim i drugim oblastima.

Abstract

The aim of this research was to conduct a population study, which results will be used to calculate allele and haplotype frequencies, determine the value of relevant statistical parameters and assess the possibility of applying X-STR markers analysis in the fields of forensics, human identification and kinship testing. The study included 200 unrelated adults. DNA isolation was performed by Chelex method. DNA amplification was performed by PCR method, using commercial Mentype Argus X-12 PCR Amplification Kit. Separation and detection of fragments was obtained by capillary electrophoresis using GeneScan and Genotyper program. Statistical analysis of the results was performed using Arlequin and GENEPOP program. For visualization of interpopulation genetic distances POPTREE2 program was used. The results show that the analysis of X-STR markers can be successfully applied in the field of forensics, human identification and kinship testing in the population of Vojvodina, as well as to serve as a basis for further research in population genetic, anthropological, demographic and other scientific areas. According to authors current knowledge, the study of X chromosome microsatellite markers was never conducted in our country and these data represent the first population data of its kind in Serbia.

REFERENCE

1. Joblig MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Rev Genet* 2004;5:739-751.
2. Wright S. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 1951;15(4):323-354.
3. Balding DJ, Nichols RA. A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity and paternity. *Genetica* (Springer) 1995;96:3-12.
4. Walsh BS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 1991;10:506-513.
5. Mentype® Argus X-8 PCR Amplification Kit User's Manual. Biotype AG, Dresden, Germany, 2009.
6. Kishida T, Wang W, Fukuda M, Tamaki Y. Duplex PCR of the Y-27H39 and HPRT loci with reference to Japanese population data on the HPRT locus. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1997;51:67-69.
7. Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, Busque L. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J Forensic Sci* 1998;43:1046-1049.
8. Kruger J, Fuhrmann W, Lichte KH, Steffens C. On the utilization of erythrocyte acid phosphatase polymorphism in paternity evaluation. *Dtsch Z Gerichtl Med* 1968;64:127-146.
9. Botstein D, White RI, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980;32:314-331.
10. Nei M, Roychoudhury AK. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 1974;76:379-390.
11. Takezaki N, Nei M, Tamura K. POP-TREE2: Software for Constructing Population Trees from Allele Frequency Data and Computing Other Population Statistics with Windows Interface. *Mol Biol Evol* 2010;27(4):747-752.
12. Latter BDH. Selection in finite populations with multiple alleles. III. Genetic divergence with centripetal selection and mutation. *Genetics* 1972;70:475-490.
13. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 2012;28:2537-2539.
14. Lim EJ, Lee HY, Sim JE, Yang WI, Shi KJ. Genetic Polymorphism and Haplotype Analysis of 4 Tightly Linked X-STR Duos in Koreans. *Croat Med J* 2009;50:305-312.
15. Hedman M, Palo JU, Sajantila A. X-STR diversity patterns in the Finnish and the Somali population. *Forensic Sci Int Genet* 2009;3(3):173-178.
16. Zeng XP, Ren Z, Chen JD, Lu DJ, Tong DY, Chen H, Sun HJ. A genetics polymorphism of twelve X-chromosomal STR loci in Chinese Han population from Guangdong Province. *Forensic Sci Int Genet* 2011;3:e365-366.
17. Diegoli T, Linacre A, Vallone P, Butler J, Coble M. Population genetic data for 15 X chromosomal short tandem repeat markers in three U.S. populations. *Forensic Sci Int Genet* 2014;8(1):64-67.
18. Poetsch M, Knop A, El-Mostaqim D, Rakotomavo N, von Wurmb-Schwark N. Allele frequencies of 11 X-chromosomal loci of two population samples from Africa. *Int J Legal Med* 2011;125(2):307-314.
19. Gomes I, Amorim A, Pereira V, Carracedo A, Gusmao L. Genetic patterns of 10 X chromosome short tandem repeats in an Asian population from Macau. *Forensic Sci Int Genet Suppl Series* 2009;2:402-404.
20. Gršković B, Zidkova A, Stenzl V, Popović M, Primorac D, Mršić G. Analysis of 8 X-chromosomal markers in the population of central Croatia. *Croat Med J* 2013;54(3):238-247.
21. Tomas C, Pereira V, Morling N. Analysis of 12 X-STRs in Greenlanders, Danes and Somalis using Argus X-12. *Int J Legal Med* 2012;126:121-128.
22. Becker D, Rodig H, Augustin C, Edelmann J, Gotz F, Hering S, et al. Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit. *Forensic Sci Int Genet* 2008 Jan;2(1):69-74.
23. Bini C, Riccardi LN, Ceccardi S, Carano F, Sarno S, Luiselli D, et al. Expanding X-chromosomal forensic haplotype frequencies database: Italian population data of four linkage groups. *Forensic Sci Int Genet* 2015;15:127-130.
24. Rebala K, Kotova SA, Rybakova VI, Zabauskaya TV, Shyla AA, Spivak AA, et al. Variation of X-chromosomal microsatellites in Belarus within the context of their genetic diversity in Europe. *Forensic Sci Int Genet* 2015;16:105-111.
25. Horvath G, Zalan A, Kis Z, Pamjav H. A genetic study of 12 STR loci in the Hungarian population. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6:e46-47.
26. Zidkova A, Capek P, Horinek A, Coufalova P. Investigator® Argus X-12 study on the population of Czech Republic: comparison of linked and unlinked XSTRs for kinship analysis. *Electrophoresis* 2014;35(14):1989-1992.
27. Tomas C, Skitsa I, Steinmeier E, Poulsen L, Ampati A, Borsting C, et al. Results for five sets of forensic genetic markers studied in a Greek population sample. *Forensic Sci Int Genet* 2015;16:132-137.