

DNA-ČIP TEHNOLOGIJA

DNA CHIP TECHNOLOGY

Snježana Bolarić, Marija Trusk, V. Kozumplik, A. Vokurka

SAŽETAK

Usporedno s razvojem DNA molekularnih markera kao ishodišnih tehnologija analiza DNA, 90-tih godina prošlog stoljeća znanstvenici su počeli razvijati novu tehnologiju nazvanu DNA-čip. Naziv dolazi od toga što se, tehnički gledano, na maloj staklenoj površini nalaze oligonukleotidni lanci poznatog slijeda baza, što podsjeća na elektronički čip. Ostali nazivi koji se spominju u literaturi su: *biochip*, *DNA microarray*, *gene array*, *gene chip* i drugi. Prema namjeni eksperimenata razvijena su tri glavna tipa DNA-čipa: sekvencijski čip, ekspresijski čip i čip komparativne hibridizacije. Osnovna podjela DNA-čipova na oligonukleotidne i cDNA (komplementarna DNA) proizlazi iz njihove svrhe i načina korištenja. Identifikacija mutacija i DNA varijacija na cjelokupnom genomu te sekvenciranje i analiza genoma može se izvesti oligonukleotidnim DNA-čipom, dok se cDNA-čip najčešće koristi u proučavanju ekspresije gena, detekciji određenih proteinskih komponenti u hrani, detekciji mutiranih gena, te pri određivanju sigurnosti konzumiranja GMO biljaka. Važnim područjem korištenja DNA-čipa smatra se analiza genske ekspresije i otkrivanje polimorfizma na razini nukleotida (SNP - *Single Nucleotide Polymorphisms*).

Ključne riječi: DNA-čip, genom, ekspresija gena, dijagnostika

ABSTRACT

Concurrently with the development of molecular markers as the basic technologies of DNA analyses, scientists started to develop new technology, called DNA-chip. The name comes from the technical aspects of the chip, which consists of the small glass plate with attached oligonucleotide strains of DNA on it and looks similar to electronic chip. The other names found in literature are *biochip*, *DNA microarray*, *gene array*, *gene chip* and others. According to

the experimental purpose of the chip, three main types of chips have been developed: sequential chip, expressional chip and chip of comparative hibridization. The basic classification of DNA-chips into oligonucleotide chips and cDNA chips is based on their purpose and the way of use. Detection of mutations and DNA variations in complete genomes, and sequencing and analysis of a genome may be performed with oligonucleotide DNA-chip, while cDNA-chip is mainly used in research of gene expression, detection of particular protein components in food, detection of gene mutations and assessment of biosafety in consuming GMO plants. An important field of application of DNA-chip is analysis of gene expression and detection of variations on the level of nucleotides (*SNP - Single Nucleotide Polymorphisms*).

Key words: DNA chip, genome, gene expression, diagnostics

UVOD

Od razvoja elektronskih čipova u XX stoljeću do izuma DNA-čip tehnologije, znanstvenici su nastojali spojiti te dvije potpuno različite znanstvene discipline. Cilj je bio spojiti elektronski s biološkim materijalom, a određeni uspjeh je postignut kad su izumljeni prvi biosenzori. Kombinacija mikročipova i bioloških materijala omogućila je konstruiranje biosenzora za mjerenje sadržaja šećera, bjelančevina i hormona u tjelesnim tekućinama, zagađivača u vodi i plinova u zraku. Biosenzori rade na način da supstrat, koji se mjeri, prolazi kroz tanku membranu i nailazi na biološki senzor (enzim, protutijelo ili cijela mikrobnna stanica). Kao proizvod reakcije između supstrata i senzora mogu nastati električna struja, toplina, plin ili neki topivi kemijski spoj. Nastali proizvod prolazi kroz još jednu tanku membranu i dolazi do mjernog pretvarača, koji mjeri količinu proizvoda stvaranjem električnog signala što se izravno očitava. Nakon izuma biosenzora, biotehnolozi su krenuli u istraživanja s ciljem konstruiranja biočipa, nastalog udruženim naporima biotehnologije i industrije mikročipova. Na temelju razvoja silicijskog mikročipa proučavani su biočipovi (preteča DNA-čipa) u kojima je umjesto silicija bio različit biološki materijal. Osnovna jedinica biočipa jest molekula organskog poluvodiča uložena u proteinski okvir i učvršćena u cjelinu na proteinskoj podlozi. Električni signali putuju poluvodičem kao što signali prolaze kroz neke dijelove silicijskog mikročipa (Ouellette, 1998; Hwang, 1999).

DNA-čip tehnologija će biti ključ za shvaćanje jednog od najvećih znanstvenih izazova nadolazećeg vremena – analize načina na koji svi geni nekog organizma funkcioniraju zajedno kao jedan vrlo kompleksan sistem (Hood i sur. 1987).

Da bi se svi geni mogli promatrati zajedno, potrebno je poznavati cjelokupan genom proučavanog organizma. U početku se radilo na mikroorganizmima (kvascima) čiji je genom bio u potpunosti otkriven, zatim su na red došle biljke, insekti i glodavci sve dok nije otkriven cijeli genom čovjeka. Danas su znanstvenici zaokupljeni otkrivanjem kompletnih DNA sekvenci za različite organizme (Amato, 1998; Hwang, 1997)

Prvi DNA-čip eksperimenti izvedeni su na kvascima (*Saccharomyces cerevisiae*). Jedan od eksperimenata je bio proučavanje načina genomske ekspresije kod kvasca kao reakcije na promjenu uvjeta okoline gdje je korišten mikroslijed (*microarray*) za mjerenje promjena na transkripcijskoj razini za skoro svaki gen kvasca (Gasch i sur. 2000). Od uvjeta okoline koji su mijenjani, gledalo se kako stanica reagira na temperaturni šok, vodikov peroksid, hiper i hipo-osmotski šok, superoksid, sulfhidril, itd. Ogromna skupina gena (~ 900) pokazala je sličnu jačinu reakcije na te okolinske promjene. Ovim eksperimentima se došlo do više zaključaka i rezultata. Jedan od važnijih je način ekspresije gena kao rezultat reakcije na djelovanje različitih vrsta stresa (*ESR* – „*enviromental stress response*“) (Gasch i sur. 2000).

Drugi primjer eksperimenta koji su proveli Patrick Brown i njegovi kolege sa Sveučilišta Stanford istražuje detalje o stvaranju spora u kvasca. Stimulirali su kvasac na proizvodnju spora (oduzimajući mu hranu) te ponavljali analizu čipa šest puta tijekom 12 sati. Gledajući kod kojih je gena došlo do ekspresije i kada, Brown i njegovi kolege su došli do novih saznanja o tome kako se stanica kvasca genetski mijenja da bi proizvela spore (Anonymous, 2008).

U samo deset godina, DNA-čipovi su imali revolucionarnu ulogu u molekularnoj bioanalitici. DNA-čipovi se koriste kao osnovni alat u nastojanjima da se povežu genomski podaci i njihova biološka funkcija (Amato, 1998; Hwang, 1997).

DNA molekula nije jedini materijal koji se koristi na biočipovima. Drugi tipovi biočipova koji su još u fazi razvoja ili/i istraživanja uključuju proteinske čipove, čipove antitijela i druge *lab-on-chip* naprave što su rezultat minijaturizacije (Henke, 1998).

U agronomiji se koriste DNA-čipovi koji su izrađeni isključivo za određene vrste kultiviranog bilja. Jedan od primjera je Affymetrixov *GeneChip® Tomato Genome Array* izrađen isključivo za proučavanje genske ekspresije rajčice (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Složeni slijed (*array*) je sastavljen od preko 10 000 setova proba izoliranih iz rajčica kako bi se istražilo preko 9 200 njenih transkripata (Anonymous, 2008).

DNA-ČIP TEHNOLOGIJA

U literaturi se susreću različiti nazivi DNA-čip tehnologije, kao što su *DNA chip*, *biochip*, *DNA microarray*, *gene array*, *gene chip*, i dr. U novije se vrijeme koristi i naziv "*genome chip*" indicirajući da se ova tehnologija koristi za promatranje cijelog genoma na samo jednom čipu (McGall i sur. 2006).

DNA-čip se sastoji od velikog broja aktivnih polja koncentriranih na površini mikrometarskog reda veličine (i do više stotina tisuća točaka od nekoliko μm u promjeru) pričvršćenih za tvrdu podlogu (npr. staklo, silikon). Svako polje sadrži određenu poznatu probu (npr. jednostruki lanac DNA, oligonukleotide ili genske fragmente). Te probe imaju sposobnost prepoznavanja komplementarnih baza s kojima formiraju dvostruki lanac u procesu hibridizacije. Kad se uroni DNA-čip u otopinu koja sadrži nepoznate mete (nukleotidne sekvence), hibridizacija će se pojaviti samo na komplementarnim mjestima. Detekcija ovih polja (na čvrstoj podlozi) omogućuje identifikaciju mete. Trenutno se detekcija hibridizacije na podlozi provodi korištenjem markera (fluorescentne boje) koji su prethodno fiksirani na sve mete (McGall i sur. 2006).

TIPOVI DNA-ČIPA

U okviru DNA-čipa razlikujemo makro i mikročipove (*macro-* i *microarray*). Razlika između makro i mikročipova je u broju aktivnih polja i njihovoj veličini. Makročipovi sadrže nekoliko desetaka točaka (polja) koje su 500 (neki autori navode 300) ili više μm u promjeru, a izrađene su ručno ili pomoću robota. Mikročipovi sadrže tisuće točaka veličine manje od 500 (ili 300) μm u promjeru. Za njihovu je proizvodnju potrebna specijalna robotizirana oprema (Hwang, 1997; McGall i sur. 2006).

Prema terminologiji razlikujemo dvije tehnike izrade DNA-čipa: (1) DNA-čip i (2) mikročip koji se često naizmjenično koriste. DNA-čip (ili makročip) ima manju gustoću polja po jedinici površine, dok mikročip ima veću gustoću polja po jedinici površine i može sadržavati i do nekoliko tisuća polja (Henke, 1999).

Prema namjeni razlikujemo tri glavna tipa DNA-čipa (1) sekvencijski čip, (2) ekspresijski čip i (3) čip komparativne hibridizacije. Sekvencijski čip je prvi, najstariji i najčešće spominjan u popularnim člancima. Na sekvencijskom čipu nalaze se probe - cDNA segmenti obično dugi 20 nukleotida pričvršćenih za supstrat na stakalcu. Uzorci/ mete (označena DNA molekula specifičnih sekvenci nukleotidnih baza u procesu hibridizacije) se zatim izlažu probama na čipu i mjesta spajanja meta i proba (hibridizacijom) determiniraju rezultate eksperimenta. Ovaj dizajn se naziva sekvenciranje hibridizacijom ili SBH (od engl. „sequencing by hybridization“), a namjena mu je određivanje DNA sekvenci uzorka. Ekspresijski čip je konstruiran s namjerom utvrđivanja stupnja ekspresije određenog gena mjerenjem količine mRNA koju proizvede taj gen. To se postiže konstrukcijom čipova sa specifičnim setovima proba (kao suprotnost sekvencijskom čipu koji sadrži sve moguće kombinacije proba. Rezultati se uspoređuju s kontrolom kako bi se utvrdio stupanj promjene u ekspresiji određenog gena. Ovi čipovi su korisni pri dijagnozi i tretiranju bolesti povezanih s određenim genetskim ekspresijama, kao što su neke vrste raka. Čip komparativne hibridizacije je molekularno citogenetska metoda za analizu kopija pojedinih gena u ukupnoj količini DNA, a dizajniran je za utvrđivanje relativne količine date genetske sekvence. Variranje kopija pojedinih gena povezano je s povećanim rizikom pacijenata od nekih onkoloških, neuroloških i psihijatrijskih bolesti, kao i s njihovim dijagnostičiranjem. Ovim tipom čipa također se otkrivaju i genetske mutacije tipa kromosomskih aberacija. To se obično obavlja korištenjem zdravog tkiva kao reference u usporedbi s uzorkom bolesnog tkiva (Henke, 1999; Hwang, 1999; Drmanac i sur. 2002).

TEHNIKA IZRADE DNA-ČIPA

S obzirom na način proizvodnje, primjenu, način očitavanja i prezentiranja rezultata, razlikujemo više različitih podjela DNA-čipa. S obzirom na vrstu probe razlikujemo oligonukleotidni i cDNA-čip (*cDNA-chip/array*). Na oligonukleotidnom čipu se nalaze probe kratkih nukleotidnih sekvenci. U

principu se naziv čipa odnosi na specifičnu tehniku proizvodnje koja objedinjuje kemijsku sintezu s tehnologijom fotolitografije. Oligonukleotidne sekvence su sintetizirane direktno na čip (*in situ*). Sekvence mogu biti duže (60 baznih proba) ili kraće (25 baznih proba), ovisno o namjeni čipa. Prednost manjih proba je veća specifičnost, uz vrlo malu mogućnost kontaminacije s drugim sekvencama (kao što je slučaj kod cDNA-čipa) jer se probe sintetiziraju *in situ*. Glavni nedostatak je visoka cijena. Proizvodnja fotolitografskih maski iziskuje veliku financijsku investiciju. Nadalje, fotolitografske maske se bez dodatnih troškova ne mogu izmijeniti da bi se proizveli drugačiji oligonukleotidi (Sugnet i sur. 1998; Theriault i sur. 1999; Lipshutz i sur. 1999).

cDNA-čip se odnosi na mikročip, a naziva se i točkasti čip (*spotted array*). Proizvodnja cDNA-čipa zahtijeva određen međukorak koji nije potreban kod proizvodnje oligonukleotidnog čipa, a to je korištenje enzima obrnute transkriptaze za proizvodnju cDNA i PCR-a (*polymerase chain reaction*) za umnažanje cDNA komplementarnih odgovarajućoj mRNA. Prema tome, probe cDNA čipa su oligonukleotidi, cDNA ili mali fragmenti PCR produkata koji se podudaraju (komplementarni su) s mRNA. Probe se prvo sintetiziraju, a tek nakon toga deponiraju na površinu čipa koja je najčešće staklena (a može biti plastična ili najlonska membrana), jer većina laboratorija koristi staklena mikroskopska stakalca. Za deponiranje proba na supstrat koristi se robot koji na vrhu svoje robotske ruke ima ugrađene igle koje uranjaju u posude s DNA probama i odlažu ih na predviđene lokacije na površini čipa. Dobiveni uzorak na čipu predstavlja profile nukleinskih kiselina pripremljenih proba koje su spremne hibridizirati s komplementarnim cDNA metama pripremljenima obrnutom transkripcijom s mRNA iz eksperimentalnih uzoraka (Skena i sur. 1995; Sugnet, 1998; Duggan i sur. 1994).

Ovu tehnologiju za svoja istraživanja koriste znanstvenici da bi proizveli tzv. kućno isprintane mikrosljedove (čipove) u vlastitim laboratorijima. Takvi čipovi su za razliku od oligonukleotidnih lako prilagodljivi različitim eksperimentima, jer istraživači mogu birati probe i lokacije printanja na čipu, sintetizirati probe u vlastitom laboratoriju te ih ujedno i deponirati na čip. Znanstvenici u vlastitim laboratorijima također mogu proizvesti vlastite označene uzorke za hibridizaciju, hibridizirati ih na čip te na kraju očitati čip pomoću vlastite opreme. Sve to omogućuje relativno nisku cijenu proizvodnje čipa za velik broj različitih istraživanja i na taj se način izbjegavaju veliki troškovi prilikom nabave skupih komercijalnih čipova što sadrže velik broj gena

koji nisu zanimljivi istraživačima. Nedostatak kućno izrađenih čipova je smanjena razina njihove osjetljivosti u usporedbi s komercijalnim čipovima, što je vjerojatno posljedica slabije djelotvornosti printanja (Sugnet, 1998).

S bzirom na tip eksperimenta razlikujemo jednostruki i dvostruki marker eksperiment. Najjednostavniji tip čip-eksperimenta je jednostruki marker eksperiment. U tu se svrhu čip mora duplicirati kako bi se dobila dva identična čipa na kojima se namjerava proučiti ekspresija gena u dva različita uvjeta tj. tretmana. Duplicirani čipovi zatim hibridiziraju s metama koje su označene samo jednim markerom. Budući da se koristi samo jedan marker, ovaj eksperiment će dati uvid u apsolutnu razinu genske ekspresije. Dobiveni podaci iz različitih uvjeta (tretmana) mogu se usporediti s genima iz tzv. kontrolnog čipa. Prednost ovog sistema je da se mogu uspoređivati podaci iz različitih eksperimenata na više čipova. Apsolutna vrijednost genske ekspresije može se uspoređivati između istraživanja koja su izvedena s vremenskim razmakom od više mjeseci ili godina. Nedostatak sistema u usporedbi s dvostrukim marker sistemom je potreba za dvostruko većom količinom čipova za usporedbu različitih uzoraka u eksperimentu. Dvostruki marker eksperiment ima drugačiji pristup usporedbi ekspresije između dva različita stanja (uvjeta okoline). Na primjeru iz rada Patrick Brown laboratorija u *Stanford*-u vidi se da su cDNA mete dobivene iz stanica kvasca koje su rasle u uvjetima prisutnosti galaktoze ili glukoze. Za razlikovanje signala između dviju meta tijekom obrnute transkripcije dodani su različito fluorescentno obojeni nukleotidi, Cy3 ili Cy5 koji emitiraju svjetlo pri različitim valnim duljinama. Ovaj eksperiment se ponovi tako da se zamijeni marker. Skenirajući čip dva puta, jednom za Cy3 i jednom za Cy5, dobije se slika u kojoj se vidi omjer i jedne i druge boje te se može izmjeriti omjer transkripata iz oba uvjeta rasta (Gross i sur. 2000; Duggan i sur. 1995).

Obzirom na podjelu prema proizvođačima razlikujemo fotolitografiju i *inkjet* tehnologiju. Fotolitografijom se veže stotine genskih sekvenci na površinu čipa koristeći fotolitografske procese kao što su fotosenzitivne maske, kemijski predlošci i ostale tehnike korištene u kompjuterskoj proizvodnji čipova (Anonymous, 2008.).

Inkjet tehnologija uključuje postavljanje genskih proba na supstrat čipa korištenjem raspršivača sitnih kapljica koji su ugrađeni u *inkjet* printer. Raspršivač prska kemijsku otopinu koja sadrži genske probe u obliku određenog uzorka na supstrat čipa. Razlikujemo elektronsko i kemijsko vezanje

genskih proba na supstrat. Elektronsko vezanje je smještanje nabijenih molekula na specifična test polja. Kako DNA ima snažan negativan naboj može biti elektronički pomaknuta prema području pozitivnog naboja. Test polje ili cijeli red test polja na čipu su elektronički aktivirani pozitivnim nabojem. Otopina DNA proba je izložena na čip. Negativno nabijene probe se ubrzano kreću prema pozitivno nabijenim poljima gdje se zatim koncentriraju i kemijski vežu za to polje. Čip se zatim ispiri i dodaje se nova, drugačija otopina DNA proba. Polje po polje, red po red, DNA probe se specifičnim vezama vežu na čip. Kemijsko vezanje koristi kemijske procese za vezanje DNA proba na staklenu površinu. Prvo se individualne cDNA molekule izoliraju i amplificiraju. Zatim se mikrouzorci (zapremine oko milijuntog dijela volumena jedne kapljice vode) svake cDNA nanose na staklenu površinu čipa tako da se svaki gen nalazi na jedinstvenoj lokaciji. Mikrouzorci se zatim vežu za staklo. Ovaj proces aktivira individualne elemente na čipu, pripremajući ih na reagiranje i vezanje s komplementarnim DNA dijelovima (Theriault i sur. 1999).

ZAKLJUČAK

DNA čip tehnologija i sve njene varijante predstavljaju novi, puno snažniji alat u istraživanju genoma u usporedbi s dosad korištenim alatima. Osim detekcije varijabilnosti samih DNA molekula, DNA čip omogućuje ono što klasični sustavi molekularnih markera nisu u mogućnosti, a to je istraživanje ekspresije pojedinih gena, kao i istraživanje interakcija između pojedinih gena. Zbog toga DNA čip dobiva sve značajniju ulogu, ne samo u genetici već i u fiziologiji, dijagnostici, veterini, humanoj medicini i prehrambenoj tehnologiji, kao i u većini inspeksijskih poslova u području sanitarne zaštite i hrane.

Šira upotreba čipa očekuje se u narednom razdoblju, a ujedno i pad cijene primjene metode. Osim pada cijene, za širu upotrebu DNA čipova potrebno je i daljnje pojednostavljenje njihove primjene ali i tehničko usavršavanje radi smanjenja faktora pogreške. Velika količina podataka dobivenih pomoću DNA čipa postavlja i potrebu razvoja bioinformatičkih metoda za njihovu analizu.

Razvoj DNA čipa će u konačnici biti osnova za širu upotrebu novih metoda dijagnostike u zaštiti bilja, fitosanitarnoj inspekciji, veterinarskoj zaštiti i inspekciji životinja, kao i u analizi hrane, ljudske i animalne. Te metode se mogu slikovito objasniti imenom "DNA laboratorij na čipu" (*DNA laboratory on a chip*), a sve se služe istim principom, tj. hibridizacijom i analizom

ekspresije gena. Karakteristike "DNA laboratorija na čipu" bile bi specifičnost, brzina, niska cijena primjene i jednostavnost, što bi ujedno omogućilo puno širu primjenu u već navedenim područjima ljudske djelatnosti.

LITERATURA

- Anonymous (2008): <http://www.affymetrix.com>
- Amato I. (1998): Micromachines: Fomenting a revolution in miniature. *Science* 282 (5388): 402-405.
- Drmanac, R., Drmanac, S., Chui, G., Diaz, R., Hou, A., Jin, H., Jin, P., Kwon, S., Lacy, S., Moeur, B., Shafto, J., Swanson, D., Ukrainczyk, T., Xu, C., Little, D. (2002): Sequencing by hybridization (SBH): Advantages, achievements, and opportunities. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 77: 75-101.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J. M. (1999): Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet. Suppl.* 21: 10-14.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Camel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P. O. (2000): genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* 11 (12): 4241-4257.
- Gross, C., Kelleher, M., Iyer, V. R., Brown, P. O., Winge, D. R. (2000). Identification of the copper regulon in *saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J. Biol. Chem.* 275, 41: 32310-32316.
- Henke, C. (1999): Big business from tiny molecules. *IVD Technology*, Nov 9, 31.
- Hood, L. E., Hunkapiller, M. W., Smith, L. M. (1987): Automated DNA sequencing and analysis of the human genome. *Genomics*, 1: 201-212.
- Hwang, S. Y. (1997): Whole genome analysis using DNA chips. *Korean Soc. Med. Biochem. Mol. Biol. News* 4: 28-34.
- Hwang, S. Y. (1999): DNA chip technologies: Array of hope. *Korean Soc. Med. Biochem. Mol. Biol. News* 6: 19-23.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T. R., Lockhart, D. J. (1999): High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet. Supp.* 21: 20-24.
- McGall, G. H., Christians, F. C. (2006): High-density genechip oligonucleotide probe arrays. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Chip technology* 77, 21-43, Springer, Germany
- Ouellette, J. (1998): Biosensors: Microelectronics marries biology. *The Industrial Physicist* 4 (3): 11-14.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.

Sugnet, C. (1998): Microarray FAQ.

<http://www.soe.ucsc.edu/~sugnet/microarray/microarrayFAQ.html>

Theriault, T. P., Winder, S. C., Gamble, R. C. (1999): Application of ink-jet printing technology to the manufacture of molecular arrays. *DNA Microarrays*. Oxford, UK: 101-120.

Adresa autora – Author's address:

Doc. dr. sc. Snježana Bolarić (sbolaric@agr.hr)

Marija Trusk, dipl. ing. agr.

Prof. dr. sc. Vinko Kozumplik¹(vkozumplik@agr.hr)

Primljeno – Received:

30.06.2009.

Mr. sc. Aleš Vokurka¹, (avokurka@agr.hr)

Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku, biometriku i eksperimentiranje, Svetošimunska cesta 25, HR-10000 Zagreb