



Lehr- und Forschungszentrum  
Landwirtschaft  
[www.raumberg-gumpenstein.at](http://www.raumberg-gumpenstein.at)

# Abschlussbericht FADNAB

Projekt Nr. 2340

## Österreichische DNA-Bank für landwirtschaftliche Nutztiere

Austrian DNA-Bank for Farm Animals

### Projektleitung:

Dipl.Tzt. Beate Berger, LFZ Raumberg-Gumpenstein

### Projektmitarbeiter:

Dr. Franz Fischerleitner, LFZ Raumberg-Gumpenstein

### Projektpartner:

DI, Dr. Roswitha Baumung, Universität für Bodenkultur

DI, Dr. Hans Sölkner, Universität für Bodenkultur

### Projektlaufzeit:

2006 – 2007



[lebensministerium.at](http://lebensministerium.at)

[www.raumberg-gumpenstein.at](http://www.raumberg-gumpenstein.at)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>2</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>4</b>
TECHNIKEN ZUR DNA-PRÄPARATION .....	4
<i>a) Fällung der DNA und RNA mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Aussalzungsmethode)</i> .....	5
<i>b) Adsorption der DNA und RNA an standardisierte Membranen (Anionenaustauscher, spin-columns)</i> .....	5
PROBENMATERIAL .....	6
QUALITÄTSSICHERUNG.....	7
DATENBANK .....	8
<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>8</b>
METHODENVERGLEICH.....	8
DATENVERARBEITUNG .....	10
VERWENDUNG DER DNA-BANK.....	10
<b>Schlussfolgerungen</b> .....	<b>10</b>
<b>Literatur</b> .....	<b>11</b>

## Zusammenfassung

Ziel des Projektes war in Übereinstimmung mit den Forderungen der CBD und FAO die Einrichtung einer nationalen DNA Bank für landwirtschaftliche tiergenetische Ressourcen analog zur bestehenden Österreichischen Genbank für Nutztiere. Die Entscheidung genomische DNA zu verwenden fiel aufgrund der derzeitigen intensiven Diskussionen in internationalen Gremien über Zugangsrechte zu und gerechten Vorteilsausgleich bei tiergenetischen Ressourcen (access and benefit sharing). Bei der Lagerung von nicht vermehrungsfähiger (klonierbarer) isolierter DNA entfallen diese rechtlichen Probleme.

Im Rahmen des Projektes wurden zwei Methoden zur Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut von Nutztieren verglichen, ein Laborprotokoll zur Isolierung und Qualitätssicherung erarbeitet, eine Datenbank zur Verwaltung des Kryolagers erstellt und 660 Proben von 24 Rassen der Spezies Rind, Schaf, Ziege und Schwein gesammelt.

Die Isolierung mit der Anoinenaustauschmethode hat sich als besonders geeignet für die routinemäßige Anwendung erwiesen.

Zum weiteren Ausbau der DNA-Bank ist geplant von jeder Rasse bei annähernd ausgeglichenem Geschlechterverhältnis zwischen 80 und 100 Proben anzulegen und diese Sammlung nach 5 Generationen (Tierartspezifisch) zu wiederholen. Dadurch wird ein weitgehend komplettes genetisches Archiv der österreichischen Tierzucht auf dem Gebiet Landwirtschaftlicher Nutztiere entstehen.

Die DNA-Bank ist bereits in einem nationalen und einem internationalen Projekt zur Charakterisierung von Rinderrassen genutzt worden.

## Summary

In accordance with the CBD and FAO the main goal of the project was the setup of a national DNA-bank for farm animals alongside the Austrian Gene Bank for Farm Animals. The decision to use genomic DNA was influenced by the ongoing debate in international boards on access and benefit sharing in animal genetic resources. These legal aspects are not relevant in case of storage of not reproducible (clonable) isolated DNA.

During the project two methods for the isolation of genomic DNA from EDTA-blood of farm animals were compared, a lab-protocol for isolation and quality control was established, a database for the administration of the cryo-storage was set up and 660 samples of 24 breeds of the species cattle, sheep, goat and pig were collected..

Isolation using the spin-column method proved to be the most flexible and convenient method for lab routine.

The further development of the DNA-bank will store 80 to 100 samples of each breed with a roughly equal gender ratio. The collection will be repeated after 5 generations of each species building a comprehensive genetic archive of the Austrian farm animal breeding.

The DNA-bank was already used in one national and one international project on characterisation of cattle breeds.

## Einleitung

Die möglichst umfassende Charakterisierung vorhandener genetischer Ressourcen ist in der Tierzucht seit Jahren ein Gebot. Die Charakterisierung bestimmter Eigenschaften innerhalb und zwischen den Rassen, die genetischen Distanzen bestimmter Rassen zueinander, die Diagnostik von Erbfehlern und der Nachweis züchterisch vorteilhafter Genvarianten sind primäre Forschungsfragen, deren Beantwortung von der landwirtschaftlichen Tierzucht, aber auch von internationalen Verträgen wie der CBD und dem Global Plan of Action der FAO vehement gefordert wird (FAO 1999; FAO 2000). Eine genetische Übersicht über die bestehende Nutztierpopulation eines Landes bzw. deren Entwicklung kann die Reaktionen auf veränderte Umwelt- und/oder Marktbedingungen effizienter gestalten, bzw. erst ermöglichen (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 2000, Milligan, L. P. 2002).

Fast alle Forschungen zur Genanalyse und Determinierung von Genvarianten starten mit der Sammlung und Präparation von genomischer DNA (Simianer, H. 2002, Sölkner, J. und Baumung, R.. 2002, 2004). Es sind mehrere Techniken bekannt, die eine entsprechende Präparation genomischer DNA erlauben und die spätere Charakterisierung von DNA ermöglichen. Zur Erstellung einer DNA-Bank für Nutztiere ist somit der erste Schritt diese Techniken zu erlernen. Die gängigste Technik, die eine spätere DNA-Typisierung sicherstellt, beginnt mit dem Aufbrechen der Zellkerne der gesammelten DNA-haltigen Proben (meist Samen, Blut oder Gewebe) durch Zusatz von Natrium-Dodecylsulfat (SDS). Anschließend wird die Hauptmasse der Proteine durch proteolytische Spaltung mit Proteinase K und Extraktion mit Phenol entfernt. Durch nachträglichen Zusatz von Alkohol wird die DNA ausgefällt und kann für den langfristigen Aufbau einer DNA-Bank konserviert werden.

Je nach Fragestellung der DNA-Analysen verwendet man gegebenenfalls besondere Isolierungstechniken.

Als Faustregel gilt, dass zur Handhabung von Fragmenten bis 20.000 bp (Basenpaare) Standard-Labortechniken genügen. Zur Analyse von Fragmenten bis 40.000 bp sind etwas verfeinerte Techniken notwendig. In den allermeisten Fällen reicht eine Fragmentlänge bis 20.000 bp zur Typisierung von Allelvarianten an definierten Markergenen aus (Eding, J. H. und Laval, G. 1999, FAO 2005, Geldermann, H. 2005).

Bei diesem Projekt standen nicht die wissenschaftlichen Ergebnisse im Vordergrund, das Hauptziel war in Übereinstimmung mit den Forderungen der CBD und FAO die Grundlagen für die Einrichtung einer umfassenden DNA-Bank begleitend zur bereits etablierten Österreichischen Genbank für Nutztiere zu schaffen.

## Material und Methoden

Zum Erlernen der Technik hatte sich Frau Dr. Vlatka Cubric-Curik bereit erklärt das Personal ausführlich in die Feinheiten der Technik zur Präparation genomischer DNA einzuführen. Frau Dr. Vlatka Cubric-Curik arbeitet am Animal Science Department der Agrarfakultät in Zagreb und hat bereits mit der ÖNGENE und der Universität für Bodenkultur in Wien wissenschaftlich zusammengearbeitet. So wurden die von der ÖNGENE initiierten und finanzierten Projekte „Die genetische Differenzierung von Schafrassen im Ostalpenraum“ und „Die genetische Differenzierung von Ziegenrassen in Österreich“ gemeinsam bearbeitet. Ein Teil der DNA-Isolierung und Typisierung wurde von Frau Dr. Vlatka Cubric-Curik vorgenommen. Sie findet internationale Anerkennung auf diesem Gebiet.

Der Einführungskurs fand vom 21. bis 23. 06. 2006 am Institut für Biologische Landwirtschaft und Biodiversität der Nutztiere in Thalheim statt. Besonderer Dank gebührt der ÖNGENE für die Finanzierung des Besuches von Frau Dr. Cubric-Curik..

### *Techniken zur DNA-Präparation*

Der erste Schritt in allen Techniken zur Isolierung genomischer DNA und RNA ist die Lyse der Zellen. Dies erfolgt meist durch eine Kombination von Enzymen z.B. Lysozym und Proteinase K. Während das Lysozym die Zellwand hydrolysiert, bricht die Proteinase K gezielt die Peptidbindungen der Zytoplasmamembran auf. In anderen Methoden erfolgt der Aufschluss der Zellwände durch Detergentien z.B. eine Kombination aus Natronlauge und Natriumdodecylsulfat (SDS).

Die weitere Bearbeitung der aufgeschlossenen Proben erfolgte in diesem Projekt durch

a) Fällung der DNA und RNA mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Aussalzungsmethode)

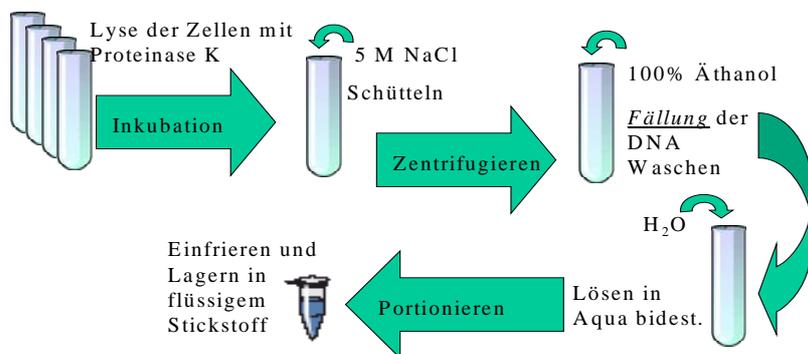
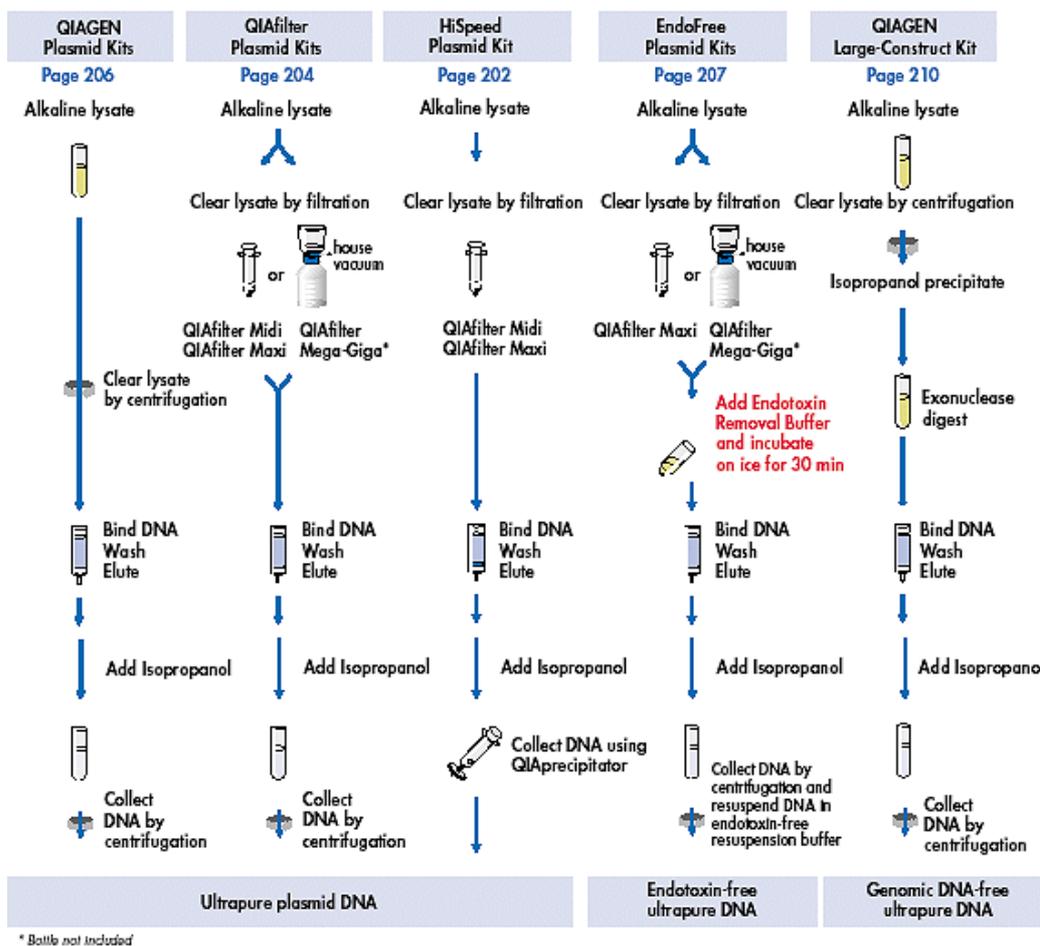


Abbildung 1: Schema der Aussalzungsmethode

b) Adsorption der DNA und RNA an standardisierte Membranen (Anionenaustauscher, spin-columns)



\* Bottle not included

Abbildung 2: Schema verschiedener Spin-column Methoden (nach Cubric-Curik, V., 2006)

In beiden Methoden wird die gewonnene DNA anschließend in wässrigen Pufferlösungen gelöst, in geeigneten Gefäßen konfektioniert (50µl) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Aussalzungsmethode liefert länger-kettige DNA bis zu 100.000 bp, die Anionenaustauschmethode kürzere Stücke zwischen 20.000 und 40.000 bp von gleichmäßiger Länge.

Für den Methodenvergleich wurde ausschließlich EDTA-Blut verwendet. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch ermittelt (Extinktion 260nm).

Eine weitere Möglichkeit ist die *Dichtegradientenzentrifugation*. Wegen des damit verbundenen apparativen Aufwandes und der Notwendigkeit größerer Investitionen wurden lediglich die Aussalzungsmethode (Laborkit Flexigene®, Fa. QIAGEN) und die Isolation mit spin-columns (DNeasy® Blood & Tissue Kit, Fa. QIAGEN) verglichen. Beide Methoden sind bezüglich der zu verarbeitenden Menge an Probenmaterial flexibel und können mit der in einem Labor üblicherweise vorhandenen Geräteausstattung angewendet werden.

### Probenmaterial

Im Rahmen des Projektes wurden vor allem Blutproben in EDTA-Röhrchen (5ml) gesammelt. Die Blutentnahme erfolgte mit dem Vacuette®-System (Fa. Greiner) aus der gestauten *Vena jugularis*. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Verarbeitung im Kühlschrank gelagert.

Samenproben wurden entweder als Nativsamen direkt bei der Absamung im Rahmen der Genbank entnommen (2ml) und bis zur Verarbeitung im Kühlschrank gelagert oder aus den Beständen der Genbank je 2 Portionen Tiefgefriersperma (0,55ml) bei Zimmertemperatur aufgetaut und sofort verarbeitet.

Im Rahmen des Projektes wurden keine Gewebeproben entnommen.

Eine Übersicht über das Probenmaterial und die vertretenen Rassen ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

**Tabelle 1: Gesammelte Proben nach Rasse und Geschlecht**

Rind				Schaf			
Rasse	Proben	männlich	weiblich	Rasse	Proben	männlich	weiblich
Brown Swiss	5	0	5	Alpines Steinschaf	3	3	0
Ennst. Bergschecke	40	12	28	Braunes Bergschaf	33	5	28
Fleckvieh	29	1	28	Lacaune	1	1	0
Holstein-Friesian	31	0	31	Montafoner Steinschaf	4	4	0
Kärntner Blondvieh	69	15	54	Suffolk	1	1	0
Murbodner	50	21	29	Waldschaf	39	5	34
Orig. Braunvieh	38	8	30	<b>Ziege</b>			
Orig. Pinzgauer	41	13	28	Rasse	Proben	männlich	weiblich
PinzgauerxRF	26	0	26	Blobe Ziege	61	20	41
Pustertaler Sprintzen	43	11	32	Burenziege	28	1	27
Tux-Zillertaler	31	8	23	Gämsf. Gebirgsziege	5	5	0
Waldv. Blondvieh	63	16	47	Pfauenziege	1	1	0
<b>Schwein</b>				Pinzg. Strahlenziege	3	3	0
Rasse	Proben	männlich	weiblich	Tauernschecke	9	4	5
Edelschwein	1	0	1				

### Qualitätssicherung

Für jeden Isolierdurchgang wird ein Laborprotokoll in Form einer Checkliste (Abb. 3) angelegt, auf dem neben den ID-Nummern der verarbeiteten Proben auch Informationen zur verwendeten Chemikaliencharge und etwaige Unregelmäßigkeiten bei der Isolierung vermerkt werden.

Jede isolierte Probe wird in der Elektrophorese semiquantitativ auf den DNA Gehalt untersucht und das Ergebnis photographisch dokumentiert (Abb. 4).

**Protokoll DNA-Isolierung mit QUIAamp® DNA blood mini kit**

Datum 22.11.2006 Bearbeiter Szila

Tierart Rind; Fleckvieh, HF, Brown Swiss; Waldschaf

Lebensnummer	Probe Nummer
AT 210.134.826 Thea	R00186
AT 543.683.647 Winni	R00187
AT 387.538.334 Tschinni	R00188
AT 543.673.447 Mira	R00189
AT 650.295.742 Anika	R00190
AT 910.382.147 Rolle	R00191
AT 730.942.457 Summi	R00192
AT 624.488.727 Pinka	R00193
AT 413.237.745 Kamille	R00194
AT 069.734.541 Sandra	O00001

Reagenzienkit Nummer \_\_\_\_\_ Substrat Blut *Elektrophorese* 24.11.06

Bemerkungen

- 1 Eppendorf beschriften  
Proteinase K 200 µl
- 2 Probe 200 µl  
Kurz rütteln
- 3 Puffer AL 200 µl  
15 sec rütteln
- 4 10 min 56°C
- 5 Kurz zentrifugieren
- 6 Alkohol 96% 200µl  
15 sec rütteln  
kurz zentrifugieren
- 7 in Spin Column einpipettieren  
1 min 8000 Umdrehungen  
neues 2 ml Röhrchen
- 8 Puffer AW 1 500 µl  
1 min 8000 Umdrehungen  
neues 2 ml Röhrchen
- 9 Puffer AW 2 500 µl  
3 min 14.000 Umdrehungen  
2 ml Röhrchen ausleeren  
1 min 14.000 Umdrehungen
- 10 Eppendorf und Deckel beschriften, Deckel abschneiden  
In Spin Column:  
Puffer AE 200µl  
2.5 bis 3 min inkubieren  
1 min 8000 Umdrehungen
- 11 Eppendorf schließen

Abbildung 3: Laborprotokoll eines Isolierdurchganges

### Datenbank

Zur Verwaltung des Kryo-Lagers wurde eine Datenbank eingerichtet. Folgende Informationen werden erfasst:

Länderkennung\*

Lebensnummer\* (eineindeutige Kennzeichnung auch über Rassen und Arten hinweg)

Name

Geschlecht

Geburtsdatum oder Geburtsjahr\*

Rasse

Art\*

Material (Blut, Gewebe, Sperma, ...)\*

Entnahmeort

Entnahmedatum

Verantwortliche Person

Vater Länderkennzeichnung

Vater Name

Mutter Länderkennzeichnung

Mutter Name

Datum der DNA-Isolierung

Nummer der DNA-Probe\* (eineindeutige Kennzeichnung auch über Rassen und Arten hinweg)

Containerbezeichnung

Containersektor

Containerlade

Anzahl der DNA-Proben

Mit \* bezeichnete Felder sind Pflichtfelder.

## Ergebnisse und Diskussion

### Methodenvergleich

Sowohl die Aussalzungsmethode als auch die Anionenaustauschmethode lieferten zuverlässige Isoliererergebnisse. Die mittleren DNA-Konzentrationen und Standardabweichungen zeigt Tabelle 2.

**Tabelle 2: DNA-Konzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$  Blut) und Standardabweichung nach Tierart und Methode**

Tierart	Methode	n	min	max	Mittelwert	Standardabw.
Rind	Aussalzung	27	33	75	46,4 <sup>a</sup>	9,52
	Ionentausch	26	28	57	45,6 <sup>a</sup>	6,7
Schaf	Aussalzung	10	52	67	59,3 <sup>b</sup>	4,85
	Ionentausch	10	48	69	58,1 <sup>b</sup>	5,72
Ziege	Aussalzung	23	67	91	79,9 <sup>c</sup>	6,11
	Ionentausch	23	67	94	78,5 <sup>c</sup>	7,08

Unterschiedliche Buchstaben:  $p < 0,05$

Bei allen bisher untersuchten Tierarten und Methoden liegt die Ausbeute an DNA über den Angaben der Hersteller in der Arbeitsanleitung. Für Humanblut werden 35µg/ml bei der Aussalzungsmethode und bis zu 30µg/ml für die Anionenaustauschmethode beschrieben. Die Unterschiede in den Konzentrationen sind in unserem Material zwischen den Methoden statistisch nicht signifikant, allerdings zeigen sich signifikante tierartsspezifische Unterschiede. Aus der veterinärmedizinischen Literatur geht hervor, dass sich die Konzentrationen der Leukozyten und der Thrombozyten als zellkernhaltige Organellen zwischen den Tierarten Rind, Schaf und Ziege nicht unterscheiden. Auch der Serumproteingehalt als mögliche Fehlerquelle zeigt keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Tierarten (Kraft, W. et al. 1997). Daher kann aus unserem Material dieser Unterschied nicht schlüssig erklärt werden.

Für den weiteren Aufbau der DNA-Bank wurde die spin-column Methode gewählt. Der Gesamtzeitaufwand für einen Isolierdurchgang ist mit etwa 2 Stunden wesentlich geringer als bei der Aussalzungsmethode (4 bis 7 Stunden inklusive Inkubation) und die Gefahr der Kontamination der Proben mit Fremd-DNA ist durch die abgeschlossene spin-column geringer. Die Länge der DNA-Fragmente zwischen 20.000 und 40.000 bp ist zur Identifizierung von Mikrosatelliten gut geeignet, lediglich für Sequenzierungen benötigt man länger-kettige DNA (Eding, J. H. und Laval, G. 1999).

Für andere Substrate als Blut werden Anwenderprotokolle von den Firmen zur Verfügung gestellt, die spezielle Lysispuffer verwenden. Die Isolationstechnik nach der Zelllyse bleibt für alle Probenmaterialien gleich.

In der Elektrophorese (0,5% Agarosegel, 30 Minuten Laufzeit, DNA-Banden mit Äthidiumbromid markiert, Aufnahme im UV-Durchlicht) zeigten sich deutlich die Unterschiede in der Länge der DNA-Fragmente (Abb. 4). Während bei der spin-column annähernd regelmäßige, scharf abgegrenzte Banden erzielt werden, ergibt die Aussalzungsmethode von der Startlinie weg verwischte Banden mit stärker fluoreszierenden Abschnitten im unteren Teil der Laufstrecke.



Abbildung 4: Elektrophoresegel mit Banden isolierter DNA – Methodenvergleich

### *Datenverarbeitung*

Für den Routinebetrieb und die Lagerung der DNA-Proben wurde eine Microsoft Access-Datenbank eingerichtet. Durch integrierte Suchfunktionen und Plausibilitätsprüfungen ist die Verwaltung des Kryolagers sehr erleichtert.

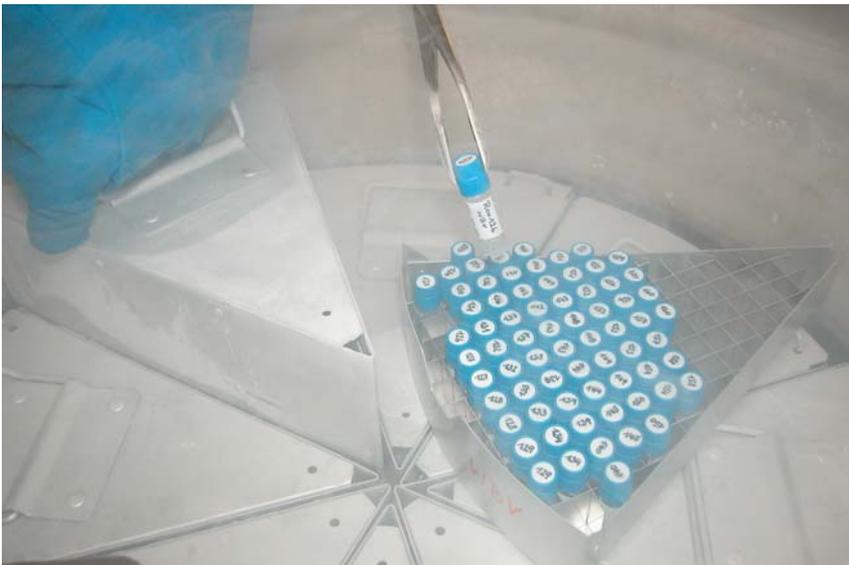
Für 2009 ist die Integration des Gesamtkataloges des Sicherungslagers (Dokumentationsarchiv Rind, Langzeitlager der Österreichischen Genbank für Nutztiere und DNA-Bank) in das internationale Netzwerk EFABIS (European Farm Animal Information System, <http://efabis.raumberg-gumpenstein.at>) geplant (Berger, B., Fischerleitner, F. 2007). In dem öffentlich zugänglichen Teil des EFABIS scheinen aus Datenschutzgründen nur die Summen der gelagerten Proben pro Rasse auf. Für den Teil CRYO Web der Datenbank kann an Anspruchsberechtigte ein persönlicher Zugang mit Password vergeben werden.

### *Verwendung der DNA-Bank*

In folgenden Projekten wurde bereits Material der Kryobank verwendet (Abb. 5):

Baumung, R., Manatrion, S., Fischerleitner, F., Medugorac, I., Preinerstorfer, A.: Genetische Charakterisierung österreichischer Rinderrassen (03/2008 bis 11/2008)

Gredler, B.: Genomische Selektion Fleckvieh, laufendes Projekt, Universität für Bodenkultur, Wien, Department für Nachhaltige Agrarsysteme, Institut für Nutztierwissenschaften



**Abbildung 5: Lagercontainer mit in Flüssigstickstoff konservierten DNA – Proben**

### **Schlussfolgerungen**

Der Aufbau und die Verwaltung einer umfassenden DNA-Bank für Nutztiere ist bei vorhandener Kryokette mit verhältnismäßig geringen Mitteln möglich. Die Menge und Qualität der mit handelsüblichen Spin-columns isolierten DNA ist ausreichend für weiterführende Analysen. Als besonders geeignetes Probenmaterial hat sich EDTA-Blut erwiesen, dadurch kann eine Probensammlung auf einfache Weise im Rahmen routinemäßiger Probennahmen (Laboruntersuchungen, Seuchenscreening, ...) erfolgen.

Durch die Verwaltung des Kryolagers mit einer Datenbank wird die Integration der Sammlung in das CRYO-Web Modul des European Farm Animal Information System (EFABIS) und damit ihre Internationalisierung stark vereinfacht.

Die DNA-Bank wird als genetisches Archiv bereits in der Aufbauphase für Forschungsprojekte genutzt.

## Literatur

- Baumung, R., Manatrinon, S., Fischerleitner, F., Medugorac, I., Preinerstorfer, A.: Genetische Charakterisierung österreichischer Rinderrassen. Abschlussbericht, Universität für Bodenkultur Wien Department für Nachhaltige Agrarsysteme, Institut für Nutztierwissenschaften 2008.
- Berger, B., Fischerleitner, F.: Ex situ conservation of endangered farm animal genetic resources in Austria. In Tagungsbericht : DAGENE-Workshop 2007, International Meeting Animal Genetic Resources, Gumpenstein, 27.6.2007
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten: Spezieller Handlungsbedarf bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Heft 487, Punkt 3.2.3; Bonn, Deutschland, 2000.
- Cubic-Curik, V.: DNA-Isolation. Vortrag am Institut für Biologische Landwirtschaft und Biodiversität der Nutztiere, Thalheim, Österreich; 21.06.2006
- Cubic-Curik, V.: Persönliche Mitteilungen 2006.
- Cunningham, E. P.: Recent Developments in Biotechnology as They Relate to Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Background Study Paper No. 10; FAO, Rom, Italien, 1999.
- Eding, J. H. und Laval, G.: Measuring genetic uniqueness in livestock. In: Genebanks and conservation of animal genetic resources. Oldenbroek, J. K. (Hrsg.), Wageningen, Niederlande, S. 35 ff. 1999.
- FAO: Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources. Executive Brief, FAO, Rom, Italien, 1999.
- FAO: Secondary Guidelines: Management of Small Populations at Risk.. FAO, Rom, Italien, 2000.
- FAO Subject 65: Re: Molecular Characterisation of Animal Genetic Resources. Forum Conf. 13 (Genetic Resources); [www.fao.org/biotech/logs/C13/210605.htm](http://www.fao.org/biotech/logs/C13/210605.htm) 2005.
- Geldermann, H.: Tier-Biotechnologie. S. 94 ff. und 485 ff. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, Deutschland, 2005.
- Hiemstra, S.J., Mäki-Tanila, A.: Use of genetic material. In: ERFP 2003. Guidelines for the constitution of National Cryopreservation Programmes for Farm Animals; Publications No. 1 of the European Regional Focal Point on Animal Genetic Resources. Hiemstra, S.J. (ed.), 2003; S. 32
- Kraft, W., Dürr, U.M., Fürli, M., Bostedt, H., Heinritzi, K.: Hämatologie. In: Kraft, W., Dürr, U.M. (Hrsg.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 4. Aufl, Schattauer, Stuttgart, Deutschland, 1997, S. 70, S. 148.
- Milligan, L. P. (2002): Canada's Livestock Animal Genetic Resources Need for a National Conservancy Strategy. Canadian Farm Animal Genetic Resources Foundation, Brighton, Canada, 2002.
- Simianer, H.: Molekulargenetische Differenzierung verschiedener Rotviehpopulationen. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Heft 493; Bonn, Deutschland, 2002.
- Sölkner, J. und Baumung, R.: Genetische Differenzierung von Schafrassen im Ostalpenraum. Abschlussbericht, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich, 2002.
- +Sölkner, J. und Baumung, R.: Genetische Differenzierung von Ziegenrassen in Österreich. Abschlussbericht, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich, 2004.