

Biotechnologia rozrodu w ratowaniu zagrożonych gatunków zwierząt

Andrzej Max

Przyroda cechuje się zmiennością. Na przestrzeni czasu powstają nowe gatunki, przystosowane do panujących aktualnie warunków, podczas gdy inne giną bezpowrotnie. Proces powstawania nowych gatunków nazywa się specjacją, natomiast ich wymieranie określane jest terminem ekstynkcja. Obecnie jej tempo jest bardzo szybkie, a przyczynia się do tego w dużej mierze działalność ludzi, których populacja gwałtownie wzrasta. Wystarczy wskazać, że całkowita liczba ludzi na Ziemi w 1900 r. wynosiła nieco ponad 1,5 mld, a obecnie jest nas blisko 7,5 mld. Przyrost naturalny wykazuje gwałtowne przyspieszenie, zwłaszcza od XX w. Wraz z zajmowaniem i wykorzystywaniem przez człowieka coraz większej powierzchni ziemi oraz oddziaływaniem na środowisko, wydawnie maleją obszary naturalnego bytowania zwierząt, a także pogarszają się ich warunki życia i rozmnażania. Te czynniki łącznie z działalnością przestępczą (kłusownictwo, nielegalny handel, dewastacja środowiska, skażenia chemiczne) powodują, że także stosunkowo niedawno wiele gatunków wymarło całkowicie, a dużo jest ginących lub zagrożonych wyginięciem. Wraz z rozwojem wiedzy i świadomości tych niepożądanych zjawisk podejmowane są poczynania mające na celu ratowanie przyrody. Oprócz działań na rzecz środowiska i naturalnej reprodukcji wykorzystuje się także techniki wspomaganego rozrodu (assisted reproductive technologies – ART). Jednym z podstawowych warunków wspomaganego rozrodu jest dokładne poznanie fizjologii czynności płciowych poszczególnych gatunków zwierząt, w szczególności ich cykliczności i sezonowości. Pozwoli to na dostosowanie poszczególnych metod do gatunku docelowego, aczkolwiek wstępne próby są zazwyczaj przeprowadzane u spokrewnionych gatunków zwierząt udomowionych. Na przykład kot domowy jest modelowym zwierzęciem w odniesieniu do dzikich kotowatych, których większość gatunków jest zagrożona wyginięciem. Wyjątkową rolę odgrywają ogrody zoologiczne, w których realizowane są programy hodowlane (captive breeding) i prowadzone obserwacje. Dla przykładu, kilkunastoletni program rozmnażania rysia iberyjskiego (*Lynx pardinus*) spowodował, że z gatunku krytycznie zagrożonego został już wyprowadzony do kategorii zagrożony (1). Celem tego artykułu jest przedstawienie wybranych procedur wspomaganego

rozrodu użytych dla ochrony zagrożonych gatunków zwierząt.

Konserwacja materiału biologicznego

Ten dział biotechnologii ma na celu zachowanie materiału genetycznego, gamet, zarodków, komórek somatycznych, tkanek lub narządów bądź ich części w stanie pozwalającym na ich wykorzystanie w przyszłości. Przechowywany materiał biologiczny może zostać użyty bezpośrednio w technikach wspomaganego rozrodu (zarodki, plemniki, oocyty) lub też jako dawca informacji genetycznej w zaawansowanych procedurach reprodukcyjnych, jak np. klonowanie. Zasoby genetyczne zwierząt gospodarskich są chronione według zasad Światowego Planu Działań na rzecz Zasobów Genetycznych Zwierząt dla Wyżywienia i Rolnictwa (Global Plan of Action for Animal Genetic Resources for Food and Agriculture). W Polsce stosowne programy są koordynowane przez Instytut Zootechniki-PIB w Balicach, który gromadzi zamrożone gamety i zarodki zwierząt hodowlanych, w tym rzadkich ras rodzimych. Powołano w tym celu Krajowy Bank Materiałów Biologicznych, który otwarto oficjalnie w 2014 r. Zasoby genetyczne w postaci wyizolowanego i zamrożonego DNA od niektórych udomowionych i wolno żyjących zwierząt gromadzi Muzeum i Instytut Zoologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie jako Krajowy Bank DNA Roślin, Grzybów i Zwierząt.

Szczególne znaczenie mają przedsięwzięcia związane z ochroną ginących i zagrożonych gatunków zwierząt dzikich. Takie banki biologiczne powstają od kilkudziesięciu lat i noszą popularną nazwę zamrożonych ogrodów zoologicznych (frozen zoos). Bardziej obrazowo, a zarazem trafnie obiekt taki bywa nazywany wspólnym arką Noego. Najbardziej znane ośrodki znajdują się w Stanach Zjednoczonych Ameryki. Są to między innymi San Diego Zoo Institute for Conservation Research oraz Audubon Center for Research of Endangered Species. Instytucje te przechowują komórki kilkuset gatunków zwierząt, w tym niektórych unikatowych. W Polsce materiał genetyczny zagrożonych wyginięciem czy szczególnie narażonych na negatywny wpływ działalności człowieka gatunków zwierząt jest gromadzony w Muzeum Górnśląskim w Bytomiu (MGB). Bank ten powstał w 2016 r., dotychczas zgromadzono w nim między

Biotechnology of reproduction in saving endangered animal species

Max A.

This paper aims at the presentation of biotechnology methods that can be applied in saving endangered animal. There is a number of species currently in danger of extinction. In order to save them for the nature many procedures are implemented including biotechnology of reproduction. Here, an overview of methods used in assisted reproductive technologies was presented. In particular, conservation of genetic resources, artificial insemination, *in vitro* fertilization, interspecies embryo transfer and cloning are discussed. Examples of successful efforts and up-to-date achievements in mammals assisted reproduction are presented.

Keywords: endangered species, assisted reproduction, biotechnology.

innymi tkanki pochodzące od kilku gatunków niedźwiedzi, wołów piżmowych i antylop. Metody i procedury pobierania próbek zostały przygotowane przez pracowników naukowych Uniwersytetu Jagiellońskiego po konsultacjach ze specjalistami z zagranicznych, np. niemieckich, laboratoriów genetycznych. Materiały, przede wszystkim kostne, są przechowywane w temp. -20° C, a pozyskiwane dzięki współpracy z wyspecjalizowaną pracownią preparacji zwierząt kręgowych, która od lat działa przy MGB. Znaczna większość próbek pochodzi od zwierząt z natury: Afryki, Ameryki Północnej i Azji. Rolą muzeum, wyróżniającą ją spośród innych placówek naukowo-badawczych, jest gromadzenie i zabezpieczanie materiałów naukowych i dowodowych w taki sposób, aby skorzystać z nich mogły następne pokolenia, stosując metody nieznane współcześnie. Jednym z pierwszych, spektakularnych sukcesów banku DNA są zakończone powodzeniem badania molekularne próbek z kolekcji MGB pobranych z dermoplastu Planty – samicy żubra wykorzystanej do odtwarzania tego gatunku w Polsce i na świecie (2). Zaczątki zamrożonego zoo powstały też na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu. Zgromadzono zasoby fibroblastów pochodzących ze skóry od 6 ras kota domowego oraz 11 gatunków dzikich kotowatych (3). Zamrożone gamety i zarodki różnych gatunków zwierząt oraz linie komórek somatycznych, między innymi zagrożonych gatunków jeleniowatych, są też zgromadzone w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt w Jastrzębcu (4).

Ciekawym pomysłem w zakresie ochrony ginących gatunków zwierząt jest pozyskanie od nich indukowanych pluripotentjalnych komórek macierzystych. Są

to komórki podobne do naturalnych komórek macierzystych (np. zarodkowych) o zdolności różnicowania się w wiele tkanek. Uzyskuje się je z komórek somatycznych, w których pobudza się do działania wybrane geny, dzięki czemu ulegają one przeprogramowaniu. Przedsięwzięcie takie wdrożono w Center for Regenerative Medicine, Department of Chemical Physiology The Scripps Research Institute w Kalifornii, generując takie komórki pochodzące od mandryla równikowego i nosorożca białego północnego, który jest podgatunkiem krytycznie zagrożonym. Tak spreparowane komórki macierzyste mogą posłużyć ratowaniu tych zwierząt (5, 6).

Sztuczne unasienianie

Metoda przenoszenia nasienia świeżego lub konserwowanego jest uznana i szeroko stosowaną techniką reprodukcji zwierząt hodowlanych. Niekiedy wykorzystuje się ją także u zwierząt nieudomowionych. Jednym z podstawowych problemów jest pobieranie nasienia od samców, które często nie są przyzwyczajone do kontaktów z człowiekiem, a ponadto bywają niebezpieczne. Czasem możliwe jest wyplukanie nasienia z pochwy samicy po naturalnym pokryciu. Niekiedy tylko mogą mieć zastosowanie metody powszechnie stosowane u zwierząt udomowionych. Wymaga to jednak specjalnych warunków hodowlanych i przygotowań. Można na przykład uzyskać nasienie przy użyciu sztucznej pochwy od niektórych przeżuwaczy (7).

Najczęściej stosowana jest elektroejakulacja. Ten sposób pozyskiwania nasienia opisano u wielu zagrożonych zwierząt, jak koala australijski (8), gepard (9, 10, 11), pantera mglista (9), nietoperze z rodzaju *Pteropus* (12), oceloty wielki, nadrzewny i tygrysi (13), tygrysy syberyjski i bengalski, lampart plamisty oraz puma (11), słoń afrykański (14), wyjec czarny (15), nosorożce (16) czy ryś iberyjski, który to gatunek należy do najbardziej zagrożonych kotowatych (17). Elektroejakulację przeprowadza się w znieczuleniu ogólnym, co umożliwia wykonanie zabiegu, ogranicza stres i negatywne doznania u zwierzęcia, jednak z drugiej strony powoduje dodatkowe ryzyko anestezjologiczne. Poza tym istnieje możliwość zanieczyszczenia nasienia moczem, co wpływa zabójczo na plemniki. Poszukuje się więc innych sposobów, które byłyby skuteczne i bezpieczne. U kotów domowych opracowano metodę pozyskiwania nasienia przez katetyzującą cewki moczowej po znieczuleniu medetomidyną. Zastosowano ją też z powodzeniem u lwa afrykańskiego (18). Od słoń afrykańskich z kolei pobierało nasienie za pomocą rektalnego masażu części miednicznej cewki moczowej oraz baniek nasieniowodów (19).

W szczególnych okolicznościach pozyskuje się nasienie z najdłuższymi *post mortem*. Może być ono następnie poddane kriokonserwacji i wykorzystane do unasieniania, jak to opisano np. u żubra europejskiego (20).

Kriokonserwacja nasienia napotyka trudności związane z różnicami gatunkowymi. Uzyskanie potomstwa po użyciu nasienia mrożonego nie zawsze jest łatwe. O ile na przykład u koali australijskich unasienianie nasieniem świeżym jest skuteczne, to użycie u nich nasienia mrożonego, podobnie jak u niektórych innych torbaczy, bywa problematyczne (21).

Kolejną trudnością jest ustalenie właściwego terminu unasieniania. Obserwacja rui i jej wykrywanie jest trudniejsze i mniej dopracowane niż u zwierząt gospodarskich, u których stanowi codzienną praktykę, a i tak niekiedy przysparza kłopotów. Wykorzystuje się zatem dodatkowe wskaźniki. Na przykład u pandy wielkiej bierze się pod uwagę stężenie estrogenów w moczu i jego dynamikę pomiędzy szczytową wartością a wyrażonym w procentach spadkiem w terminie unasieniania (22). U niektórych zwierząt można stymulować płodną ruję przy użyciu krótko działających implantów z GnRH. Po takim postępowaniu uzyskano ciążę i urodzenie potomstwa u wilka szarego (23).

Następną barierą jest sposób deponowania nasienia, co musi być dostosowane do gatunku zarówno w zakresie sprzętu, jak i przygotowania farmakologicznego. Stosowane zgłębniki powinny mieć budowę dostosowaną do anatomii zwierzęcia, które do zabiegu unasieniania często musi być ogólnie znieczulone i ułożone w odpowiedniej pozycji, aby nasienie wprowadzić do macicy (8). U niektórych zwierząt (np. kotowate) wykonuje się unasienianie domaciczne laparoskopowe. Taką technikę zastosowano np. u 10 samic ocelota, z których jedna urodziła żywe kocię płci męskiej po 78-dniowej ciąży (24). W 1997 r. uzyskano pierwsze potomstwo po sztucznej inseminacji od pantery śnieżnej. Na istniejące trudności przy przekraczaniu barier biologicznych wskazuje fakt, że spośród 15 unasienionych samic tylko u 1 rozwinęła się ciąża i zostało urodzone 1 młode (25). Podobnie, tylko 1 z 9 unasienionych laparoskopowo pum (*Felis concolor*) urodziła 1 młode (26). Lepsze wyniki udało się uzyskać u gepardów, gdzie 6/19 unasienionych samic urodziło kocięta w liczbie od 1 do 4 (9).

Zapłodnienie *in vitro*

O ile zapłodnienie *in vitro* (in vitro fertilization – IVF) jest opracowane u niektórych gatunków na skalę komercyjną, jak np. u bydła, to u innych napotyka znaczne

trudności. Podejmowane są próby wypracowania metod wspomaganego rozrodu u różnych gatunków zwierząt, w tym tych o różnym stopniu zagrożenia. Często jednak eksperymenty kończą się na uzyskaniu zarodków w stadium moruli/blastocysty bez ich przeniesienia (m.in. z powodu braku odpowiednich biorczyń) i urodzenia potomstwa. U innych gatunków, czasem nawet zwierząt udomowionych i o dobrze poznanej fizjologii, bariery biologiczne znacznie utrudniają osiągnięcie sukcesu. Pierwszy miot pochodzący z IVF u psów zaprezentowano dopiero w 2015 r. (27). W dodatku pozyskane zarodki były przed przeniesieniem do biorczyń poddane procedurze mrożenia. Daje to podstawę do wprowadzenia tych technik ART u dzikich psowatych.

Skuteczne IVF u kota domowego ma dłuższą historię. Stosowano zarówno klasyczne zapłodnienie *in vitro*, jak też metodę mikroiniekcji plemnika do ooplazmy (intracytoplasmic sperm injection – ICSI; 28, 29, 30, 31, 32). W szczególności opracowano podstawy stymulacji hormonalnej, klasyfikacji oocytów i hodowli zarodków oraz ich oceny. W ślad za tymi dokonaniami rozpoczęto próby zastosowania zapłodnienia *in vitro* u gatunków dzikich kotowatych, które zostały uwiecznione powodzeniem, jak np. u tygrysów bengalskiego i syberyjskiego (33), kota centkowanego i rysia stepowego – karakala (34).

Międzygatunkowe przenoszenie zarodków

Pewne możliwości daje wykorzystanie samic zwierząt powszechnie występujących jako matek zastępczych – biorczyń zarodków gatunków zagrożonych. Do takiego postępowania nadają się gatunki genetycznie bliskie sobie. Tak właśnie uzyskano donoszone ciążę, w których zarodki muflona europejskiego (*Ovis orientalis musimon*) zostały wprowadzone matkom zastępczym, jakimi były owce domowe (7). Innym przykładem mogą być ciążę zakończone urodzeniami, gdzie zarodki makaka królewskiego przeniesiono do macic makaka orientального (35), koziorożca pirenejskiego (*Capra pyrenaica*) do kozy domowej (36) lub gaura (*Bos gaurus*) do bydła domowego (*Bos taurus*). W tym ostatnim przypadku zakończyło się to urodzeniem żywych noworodków, które jednak przeżyły tylko do 26 godzin (37). Skuteczne okazało się międzygatunkowe przenoszenie zarodków kotowatych, jak np. kota stepowego i kota czarnołapego do kota domowego (38, 39).

Przygotowywane są też kompleksowe programy ART dla zagrożonych gatunków zwierząt, które obejmują poszczególne etapy procedury, takie jak pozyskiwanie

gamet, dojrzewanie *in vitro*, zapłodnienie *in vitro*, hodowla zarodków, kriokonserwacja i przenoszenie zarodków do biorczyń, jak to opracowano w odniesieniu do dzikiego muflona europejskiego (7).

Klonowanie

Klonowanie reprodukcyjne polega na powieleniu materiału genetycznego osobnika i uzyskaniu jego kopii genetycznych (prawie, chociaż nie stuprocentowo identycznych), stanowiących klon. Wśród różnych technik największe znaczenia praktyczne zyskało klonowanie somatyczne metodą przenoszenia jąder komórkowych (nuclear transfer – NT). W tym celu izoluje się jądro komórki somatycznej (zawierające pełen zestaw chromosomalny = 2n) zwane karioplastem, zawierające informację genetyczną klonowanego osobnika. Następnie karioplast wprowadza się do ooplastu, czyli oocyty, z którego wcześniej usunięto jego jądro komórkowe zawierające własny materiał genetyczny gamety, stanowiący połowę zestawu chromosomalnego = n). Tak zrekonstruowana bez udziału plemnika komórka pełni rolę zygoty nowego organizmu, będącą klonem wyjściowego dawcy jądra komórkowego. Pierwszym ssakiem po zastosowaniu tej metody była owca Dolly urodzona w 1996 r. Od tego czasu próbuje się wykorzystywać technikę NT także do zachowania zagrożonych gatunków lub do odtwarzania wymarłych. Często stosuje się w takich przypadkach klonowanie międzygatunkowe, gdy dawcą jest zwierzę odtwarzane, a biorcą osobnik gatunku niezagrożonego. Jednak pomimo doskonalenia procedur i dochodzenia do pewnych stadiów ciąży, uzyskanie żywych i żywotnych osobników jest nieczęste.

Klonowanie zwierząt, których liczebność jest niewielka, jest ograniczone znikomą dostępnością zarówno dawczyń oocytów, jak i biorczyń zarodków tego gatunku. Próbuje się zatem wykorzystywać samice innego gatunku jako źródło ooplastów, jak również obcogatunkowe biorczynie zarodków. Metoda ta, jak wspomniano wcześniej, nie prowadzi jednak do uzyskania identycznej kopii genetycznej, co ma miejsce w przypadku naturalnego klonu (potomstwo jednojajowe), gdyż pewne (niewielkie) ilości DNA są zawarte w mitochondriach oocyty używanego do rekonstrukcji – ooplastu. Metodą klonowania udawało się uzyskać zapłodnienie i początkowy rozwój zarodków, jednak doprowadzenie do urodzenia żywego potomstwa jest bardzo trudne do osiągnięcia i często się nie udaje (29, 40, 41, 42, 43).

W 2004 r. sklonowano zagrożonego kota nubijskiego, zwanego też źbikiem afrykańskim (*Felis silvestris lybica*). Karioplastem

były jądra fibroblastów wprowadzone do ooplastów kota domowego, którego samice były matkami zastępczymi. Spośród 12 biorczyń, u których stwierdzono ciążę, 9 urodziło w terminie, podczas gdy u pozostałych 3 doszło do resorpcji i ronień pomiędzy 30. a 48. dniem ciąży. Ostatecznie urodziło się 17 kociąt, z czego 7 było martwych, kolejnych 8 zginęło w czasie od kilku godzin do 6 tygodni. Pozostały tylko 2 żywe kocięta, które były pierwszymi dzikimi mięsożernymi uzyskanymi tą metodą (44). Z kolei spośród 11 urodzonych kociąt sklonowanego kota piaskowego (*Felis margarita*) tylko 1 osobnik przeżył 2 miesiące (45).

Częściowe powodzenie przyniosło też klonowanie międzygatunkowe przeżuwaaczy. W styczniu 2001 r. urodził się sklonowany gaur, zwierzę zagrożonego gatunku żyjącego w tropikalnych lasach Indii, Indochin i Malezji. Procedurę klonowania przeprowadzono w Advanced Cell Technology, Worcester, Massachusetts (USA). Wykorzystano komórki ze skóry martwego osobnika płci męskiej pobrane podczas sekcji i implantowano je do oocytów krowy. Wykorzystano 692 enukleowane oocyty. Tylko 81 zarodków rozwinęło się *in vitro* do stadium blastocysty, spośród nich 42 przeniesiono do macic 32 krów, a u 8 z nich potwierdzono ciążę. Od 2 krów pobrano płody do badań naukowych, 5 zaś poroniło. Tylko 1 biorczynie urodziła przez cięcie cesarskie żywego noworodka, któremu nadano imię Noah. Cielę żyło tylko 48 godzin, a przyczyną jego śmierci była choroba niezależna od procedury klonowania (46). W tym samym roku żywo urodzonym klonem zagrożonego gatunku ssaka był muflon europejski, rzadka odmiana żyjąca na Sardynii, Korsyce i Cyprze. Do klonowania użyto materiału pochodzącego od 2 padłych samic z Sardynii, które znalezione na pastwisku w czasie 18–24 godzin po śmierci. Jako karioplasty posłużyły komórki ziarniste, ooplastami zaś były oocyty owcy. Zarodki hodowano *in vitro* przez 7–8 dni do stadium blastocyst, po czym 7 zarodków przeniesiono do 4 biorczyń – owiec. Ostatecznie 1 owca urodziła 1 jagnię muflona (47).

W 2008 r. dokonano skutecznego klonowania wilka szarego z komórek somatycznych pobranych 6 godzin po śmierci. Ogółem z 372 zrekonstruowanych zarodków przeniesionych matkom zastępczym (samice psa domowego) otrzymano 3 żywe szczenięta wilka (48). Ten przykład dobitnie wskazuje na niską efektywność metody, przy bardzo wysokich kosztach. Wypowiedane są też opinie wskazujące na ryzyko, jakie niesie za sobą klonowanie, zwłaszcza wielokrotne, prowadzące do dalszego ograniczenia i tak już często niedostatecznej różnorodności genetycznej.

Podsumowanie

Podjęwane są próby, o różnym stopniu zaawansowania, zmierzające w kierunku odtworzenia metodami biotechnologicznymi wymarłych gatunków, takich jak np. tygrys tasmański, koziorożec pirenejski, tur lub nawet mamut. Bardziej wydajne są metody hodowlane, które można wykorzystać u niektórych gatunków zwierząt, dokonując ich introdukcji w inne od rodzimych rejony geograficzne, czasem na inne kontynenty. Z drugiej strony rozwija się hodowla zwierząt z przeznaczeniem do egzotycznych polowań. Wśród takich zwierząt są m.in. antylopy, bawoły, oryksy, elandy, zebry, żyrafy, ale także kotowate, jak np. lwy. Aby uzyskać informacje na ten temat, wystarczy wpisać w wyszukiwarce internetowej hasła np.: exotic hunt, exotic cull lub trophy mountain lion hunting. Myśliwi gromadzą trofea i fotografie, często nieświadomi, że podstawione do odstrzału zwierzęta mogą pochodzić z hodowli i jako takie nie wykazywać naturalnej skłonności do ucieczki przed człowiekiem, a niekiedy są pod działaniem środków uspokajających, które podaje się im przed transportem z miejsca hodowli na miejsce polowania. Ciekawe, czy ktoś z łowców orientuje się w wysiłkach innych ludzi na rzecz ochrony przyrody i zachowania dla potomności bogactwa fauny świata.

Piśmiennictwo

- Jewgenow K., Braun B.C., Dehnhard M., Göritz F.: Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species. *Proc. 8th IASCER*, Paris 2016, 18–18.
- Dobosz R. – kierownik Działu Przyrody w Muzeum Górnośląskim w Bytomiu – informacja osobista.
- Niżański W., Kochan J., Młodawska W., Nowak A., Migdał A., Prochowska S., Partyka A., Rodak O., Bugno-Poniewierska M., Witański W., Skotnicki J., Grega T., Palys M.: Pierwszy w Polsce bank komórek kota domowego i dzikich kotowatych. *XII Kongres Problemy w rozrodzie małych zwierząt*. Wrocław 1–2 października 2016 r., 114.
- Karasiewicz J., Andrzej-Modliński J.: Experimental embryology of mammals at the Jastrzebiec Institute of Genetics and Animal Breeding. *Int. J. Dev. Biol.* 2008, **52**, 157–161.
- Ben-Nun I.F., Montague S.C., Houck M.L., Ryder O., Loring J.E.: Generation of induced pluripotent stem cells from mammalian endangered species. *Methods Mol. Biol.* 2015, **1330**, 101–109.
- Ben-Nun I.F., Montague S.C., Houck M.L., Tran H.T., Garitoandia I., Leonardo T.R., Wang Y.C., Charter S.J., Laurent L.C., Ryder O.A., Loring J.E.: Indukując pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat Methods* 2011, **8**, 829–831.
- Ptak G., Clinton M., Barboni B., Muzzeddu M., Cappai P., Tischner M., Loi P.: Preservation of the wild European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biol. Reprod.* 2002, **66**, 796–801.
- Huang Y., Zhang H., Li D., Zhang G., Wei R., Huang Z., Zhou Y., Zhou Q., Liu Y., Wildt D.E., Hull V.: Relationship of the estrogen surge and multiple mates to cub paternity in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*): implications for optimal timing of copulation or artificial insemination. *Biol. Reprod.* 2012, doi: 10.1095/biol-reprod.112.102970.
- Howard J.G., Roth T.L., Byers A.P., Swanson W.F., Wildt D.E.: Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Biol. Reprod.* 1997, **56**, 1059–1068.

10. Max A., Grabiec A., Pietrak M., Bałucińska B.: Zastosowanie metody elektroejakulacji do pobrania i oceny nasienia nieplodnego goparda. *Med. Weter.* 2009, **65**, 323–325.
11. Wildt D.E., Phillips L.G., Simmons L.G., Chakraborty P.K., Brown J.L., Howard J.G., Teare A., Bush M.: A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard, and puma. *Biol. Reprod.* 1988, **38**, 245–255.
12. Melville D.F., Crichton E.G., Johnston S.D.: Semen collection, ejaculate characteristics and in vitro manipulation of spermatozoa from six species of captive flying-fox (*Pteropus* spp.). *Reprod. Fertil. Dev.* 2015, **27**, 1233–1241.
13. Morais R.N., Mucciolo R.G., Gomes M.L.F., Lacerda O., Moraes W., Moreira N., Graham L.H., Swanson W.F., Brown J.L.: Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 2002, **57**, 2027–2041.
14. Howard J.G., Bush M., de Vos V., Wildt D.E.: Electroejaculation, semen characteristics and serum testosterone concentrations of free-ranging african elephants (*Loxodonta africana*). *J. Reprod. Fertil.* 1984, **72**, 187–195.
15. Valle R.R., Guimarães M.A., Muniz J.A., Barnabe R.C., Vale W.G.: Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Theriogenology* 2004, **62**, 131–138.
16. Roth T.L., Stoops M.A., Atkinson M.W., Blumer E.S., Campbell M.K., Cameron K.N., Citino S.B., Maas A.K.: Semen collection in rhinoceroses (*Rhinoceros unicornis*, *Diceros bicornis*, *Ceratotherium simum*) by electroejaculation with a uniquely designed probe. *J. Zoo Wildl. Med.* 2005, **36**, 617–627.
17. Gañán N., González R., Garde J.J., Martínez F., Vargas A., Gomendio M., Roldan E.R.: Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 2009, **21**, 848–859.
18. Lueders I., Luther I., Scheepers G., van der Horst G.: Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology* 2012, **78**, 696–701.
19. Schmitt D.L., Hildebrandt T.B.: Manual collection and characterization of semen from Asian elephants (*Elephas maximus*). *Anim. Reprod. Sci.* 1998, **53**, 309–314.
20. Kozdrowski R., Nizański W., Dubiel A., Olech W.: Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemination: a pilot study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2011, doi: 10.1186/1477–7827–9–31.
21. Comizzoli P.: Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian J. Androl.* 2015, **17**, 640–645.
22. Huang Y., Li D., Zhou Y., Zhou Q., Li R., Wang C., Huang Z., Hull V., Zhang H.: Factors affecting the outcome of artificial insemination using cryopreserved spermatozoa in the giant panda (*Ailuropus melanoleuca*). *Zoo Biol.* 2012, **31**, 561–573.
23. Asa C.S., Bauman K., Callahan P., Bauman J., Volkman D.H., Jöchle W.: GnRH-agonist induction of fertile estrus with either natural mating or artificial insemination, followed by birth of pups in gray wolves (*Canis lupus*). *Theriogenology* 2006, **66**, 1778–1782.
24. Swanson W.F., Howard J.G., Roth T.L., Brown J.L., Alvarado T., Burton M., Starnes D., Wildt D.E.: Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *J. Reprod. Fertil.* 1996, **106**, 87–94.
25. Roth T.L., Armstrong D.L., Barrie M.T., Wildt D.E.: Seasonal effects on ovarian responsiveness to exogenous gonadotrophins and successful artificial insemination in the snow leopard (*Uncia uncia*). *Reprod. Fertil. Dev.* 1997, **9**, 285–295.
26. Barone M.A., Wildt D.E., Byers A.P., Roelke M.E., Glass C.M., Howard J.G.: Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod. Fertil.* 1994, **101**, 103–108.
27. Nagashima J.B., Sylvester S.R., Nelson J.L., Cheong S.H., Mukai C., Lambo C., Flanders J.A., Meyers-Wallen V.N., Songsasen N., Travis A.J.: Live births from domestic dog (*Canis familiaris*) embryos produced by in vitro fertilization. *PLoS One*, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0143930.
28. Goodrowe K.L., Wall R.J., O'Brien S.J., Schmidt P.M., Wildt D.E.: Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 1988, **39**, 355–372.
29. Gómez M.C., Jenkins J.A., Giraldo A., Harris R.F., King A., Dresser B.L., Pope C.E.: Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol. Reprod.* 2003, **69**, 1032–1041.
30. Pope C.E., Johnson C.A., McRae M.A., Keller G.L., Dresser B.L.: Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 1998, **53**, 221–236.
31. Pope C.E., Keller G.L., Dresser B.L.: In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1993, **47**, 189–201.
32. Pope C.E., McRae M.A., Plair B.L., Keller G.L., Dresser B.L.: In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1997, **51**, 69–82.
33. Donoghue A.M., Johnston L.A., Seal U.S., Armstrong D.L., Tilson R.L., Wolf P., Petrini K., Simmons L.G., Gross T., Wildt D.E.: In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol. Reprod.* 1990, **43**, 733–744.
34. Pope C.E., Gomez M.C., Dresser B.L.: In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology* 2006, **66**, 1518–1524.
35. Kubisch H.M., Ratterree M.S., Williams V.M., Johnson K.M., Davison B.B., Phillippi-Falkenstein K.M., Harrison R.M.: Birth of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) infants after in vitro fertilization and gestation in female rhesus or pigtailed (*Macaca nemestrina*) macaques. *Comp. Med.* 2005, **55**, 129–135.
36. Fernández-Arias A., Alabart J.L., Folch J., Beckers J.F.: Interspecies pregnancy of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) fetus in domestic goat (*Capra hircus*) recipients induces abnormally high placental levels of pregnancy-associated glycoprotein. *Theriogenology* 1999, **51**, 1419–1430.
37. Hammer C.J., Tyler H.D., Loskutoff N.M., Armstrong D.L., Funk D.J., Lindsey B.R., Simmons L.G.: Compromised development of calves (*Bos gaurus*) derived from in vitro-generated embryos and transferred interspecifically into domestic cattle (*Bos taurus*). *Theriogenology* 2001, **55**, 1447–1455.
38. Pope C.E.: Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 2000, **53**, 163–174.
39. Pope C.E., Gómez M.C., Galiguis J., Dresser B.L.: Applying embryo cryopreservation technologies to the production of domestic and black-footed cats. *Reprod. Domest. Anim.* 2012, **47** Suppl 6, 125–129.
40. Li Y., Dai Y., Du W., Zhao C., Wang L., Wang H., Liu Y., Li R., Li N.: In vitro development of yak (*Bos grunniens*) embryos generated by interspecies nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, **101**, 45–59.
41. Sansinena M.J., Hylan L., Hebert K., Denniston R.S., Godke R.A.: Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology* 2005, **63**, 1081–1091.
42. Selokar N.L., George A., Saha A.P., Sharma R., Muzaffer M., Shah R.A., Palta P., Chauhan M.S., Manik R.S., Singla S.K.: Production of interspecies handmade cloned embryos by nuclear transfer of cattle, goat and rat fibroblasts to buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, **123**, 279–282.
43. Yin X.J., Lee Y., Lee H., Kim N., Kim L., Shin H., Kong I.: In vitro production and initiation of pregnancies in interspecies nuclear transfer embryos derived from leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) nuclei fused with domestic cat (*Felis silvestris catus*) enucleated oocytes. *Theriogenology* 2006, **66**, 275–282.
44. Gómez M.C., Pope C.E., Giraldo A., Lyons L.A., Harris R.F., King A.L., Cole A., Godke R.A., Dresser B.L.: Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 2004, **6**, 247–258.
45. Gómez M.C., Pope C.E., Kutner R.H., Ricks D.M., Lyons L.A., Ruhe M., Dumas C., Lyons J., López M., Dresser B.L., Reiser J.: Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells* 2008, **10**, 469–483.
46. Appleton C.: The First Successful Cloning of a Gaur (2000), by Advanced Cell Technology. <https://embryo.asu.edu/pages/first-successful-cloning-gaur-2000-advanced-cell-technology>.
47. Loi P., Ptak G., Barboni B., Fulka J. Jr, Cappai P., Clinton M.: Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 2001, **19**, 962–964.
48. Oh H.J., Kim M.K., Jang G., Kim H.J., Hong S.G., Park J.E., Park K., Park C., Sohn S.H., Kim D.Y., Shin N.S., Lee B.C.: Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology* 2008, **70**, 638–647.