

Wybrane aspekty związane z możliwościami wykorzystania metod wspomaganego rozrodu w ochronie zagrożonych wyginięciem gatunków ssaków

Karolina Nahajło¹, Joanna Kochan², Edyta Molik¹

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ¹Katedra Biotechnologii Zwierząt,
²Instytut Nauk Weterynaryjnych,
al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków; rzmolik@cyf-kr.edu.pl

Współcześnie sięgamy po innowacyjne metody biotechniczne, które są wykorzystywane w ochronie zagrożonych wyginięciem gatunków ssaków. Powszechnie znane są metody wspomaganego rozrodu (ART), takie jak: inseminacja (AI), zapłodnienie *in vitro* (IVF), transplantacja zarodków, kriokonserwacja gamet czy klonowanie (Comizzoli i in., 2000; Holt i Pickard, 1999). Od wielu lat tworzone są rezerwy genetyczne w celu zwiększenia puli zasobów genetycznych zagrożonych gatunków, a zgromadzony materiał biologiczny jest przechowywany w bankach zasobów genetycznych (GRB) (Holt i Pickard, 1999). Głównym celem podejmowanych działań na rzecz ochrony różnorodności gatunkowej ssaków jest reintrodukcja zwierząt na ich pierwotne siedliska występowania. Jedną z najczęściej stosowanych technik wspomaganego rozrodu jest inseminacja (AI), która była wykorzystana w modulowaniu procesów rozrodu u pandy wielkiej (*Ailuropoda melanoleuca*) (Moore i in., 1984), antylopy indyjskiej (*Antilope cervicapra*) (Holt i in., 1988) czy tygrysa syberyjskiego (*Pantera tigris*) (Donoghue i in., 1992). W latach 2003–2008 przeprowadzono badania wykorzystania AI w rozrodzie słoni azjatyckich (*Elephas maximus*) w National Elephant Institute, Forest Industry Organization w Lampang. W badaniach tych wykorzystywano nasienie rozmrożone (uprzednio pobrane i zamrożone) oraz nasienie schłodzone. W 2007 r. jedna z samic poddana zabiegowi inseminacji z wykorzystaniem schłodzonego nasienia uro-

dziła potomstwo (Thongtip i in., 2009). W 2010 r. dzięki zastosowaniu metody AI na świat przyszły dwa onagry perskie (*Equus hemionus onager*) (Schook i in., 2013). W przypadku populacji onagrów perskich można uznać uzyskanie potomstwa za sukces, ponieważ liczebność tego gatunku wynosi zaledwie 395 osobników (Hemami, 2015).

Drugą metodą stosowaną od dawna w celu reintrodukcji gatunków jest zapłodnienie *in vitro* (zapłodnienie pozaustrojowe – IVF). Po raz pierwszy udany zabieg IVF udało się przeprowadzić w 1959 r. u królika (Bavister, 2002). Od tego czasu metoda ta jest wykorzystywana w ośrodkach badawczych całego świata. Podejmowane są kolejne badania, dotyczące zastosowania IVF na rzecz ochrony zagrożonych ssaków, czego przykładem jest stosowanie go u kotowatych (Lengwinat i Blottner, 1994). Kot domowy (*Felis catus*) stanowi model badawczy dla dzikich kotowatych (Luvoni, 2006), takich jak kot czarnołapy (*Felis nigripes*) czy kot arabski (*Felis margarita*) (Herrick i in., 2010). Prowadzone badania dostarczają nowych faktów naukowych, które stwarzają szanse na zastosowanie IVF do ratowania krajowych gatunków, np. żbika europejskiego (*Felis silvestris*), którego liczebność na terytorium Polski szacowana jest na około 100–150 osobników (Okarma i in., 2002) czy rysia euroazjatyckiego (*Lynx lynx*). Zapłodnienie *in vitro* (IVF) jest stosowane u różnych gatunków cechujących się nieliczną populacją, takich jak muflon europejski (*Ovis gmelini mu-*

simon) (Berlinguer i in., 2005) czy goryl nizinny (*Gorilla gorilla gorilla*) (Pope i in., 1997).

Przyszłościowymi metodami ART są – klonowanie i embriotransfer. Jedną z metod klonowania jest transplantacja jąder komórkowych. Technika ta służy klonowaniu dorosłych osobników ssaków. Zastosowanie metody transferu jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów pozwala na uzyskanie największej liczby klonowanych osobników o znanych cechach genetycznych, przeciwnie niż w przypadku klonowania zarodkowego. W klonowaniu zarodkowym wykorzystuje się nie tylko transplantację jąder, ale także bisekcję zarodków, izolację blastomerów i klonowanie chimerowe (Modliński i Karasiewicz, 2001). Wyróżnia się klonowanie wewnątrzgatunkowe i międzygatunkowe. W badaniach Lanza i in. (2000) udowodniono, że możliwy jest rozwój zarodka pozyskanego w wyniku międzygatunkowego klonowania somatycznego. *Post mortem* wyizolowano jądra komórkowe z fibroblastów skóry dorosłego samca gaura (*Bos gaurus*). Jądra te wprowadzono następnie do enukleowanych oocytów bydlęcych (*Bos taurus*). Uzyskane embriony transferowano do matek zastępczych (Lanza i in., 2000). W innym eksperymencie do klonowania zagrożonego wyginieciem muflona europejskiego (*Ovis orientalis musimon*) wykorzystano oocyty owcy domowej (*Ovis aries*) (Loi i in., 2001). W badaniach Wani i in. (2010) uzyskano potomstwo od wielbłąda (*Camelus dromedarius*) dzięki klonowaniu somatycznemu wewnątrzgatunkowemu (Wani i in., 2010). Pierwszy przypadek klonowania wymarłego ssaka koziorożca pirenejskiego bucardo (*Capra pyrenaica ssp. pyrenaica*) przeprowadzili Folch i in. (2009). W badaniach tych wykorzystano enukleowane oocyty kozy domowej (*Capra aegagrus hircus*). Embriony transferowano do biorczyń, którymi były mieszańce kozy domowej (*Capra aegagrus hircus*) i koziorożca pirenejskiego (*Capra pyrenaica*) lub samice koziorożca pirenejskiego (*Capra pyrenaica*). W przeciągu sześciu lat stworzono prawie 300 zarodków, z czego około 50 wszczepiono matkom zastępczym. W wyniku przeprowadzonego eksperymentu w 3 lata od wymarcia gatunku uzyskano pierwsze potomstwo, jednak narodzony ssak w krótkim czasie po porodzie padł. Badania sekcyjne wykazały nieprawidłowość dotyczącą obecności dodatko-

wego płata lewego płuca (Folch i in., 2009). Kolejne badania, dotyczące klonowania wilka szarego (*Canis lupus*) przeprowadzono w Seoul National University. Potomstwo urodziła suka psa (*Canis familiaris*). Klonowane osobniki dożyły wieku dorosłego (Oh i in., 2008). Klonowanie somatyczne stwarza ogromne możliwości w ratowaniu ginących gatunków, zwłaszcza zwierząt wolno żyjących, jednak metoda ta budzi wiele wątpliwości. U klonowanych zwierząt często występują dysfunkcje układu oddechowego i układu krążenia. Obserwowano także anomalie w budowie łożyska i błon płodowych, problematycznym aspektem jest duża masa urodzeniowa potomstwa (Hill i in., 1999).

Kolejnym przykładem ochrony zasobów genetycznych ginących zwierząt jest wykorzystanie klonowania do zachowania jednego z podgatunków nosorożca białego – północnego nosorożca białego (*Ceratotherium simum cottoni*). W 1960 r. populacja tego gatunku liczyła około 2360 osobników (Emslie i Brookes, 1999), a w 2006 zaobserwowano zaledwie 4 osobniki wolno żyjące w Garamba National Park w Kongo (Emslie i Lobao Tello, 2006). W 2011 r. w Kalifornii w Scripps Research Institute pozyskano komórki macierzyste z zamrożonych komórek skóry północnego nosorożca białego. Otrzymane gamety wykorzystano do zapłodnienia *in vitro*, a uzyskane zarodki transferowano do samic południowego nosorożca białego (*Ceratotherium simum ssp. samum*), który występuje stosunkowo licznie, gdyż populacja wynosi około 20 000 osobników (IUCN, 2012; Callaway, 2016). Zastosowanie metody AI pozwoliło na uzyskanie potomka samicy podgatunku południowego nosorożca białego (Hermes i in., 2009). Badania te wykazały, że stosowanie metod ART stwarza możliwości dla zwiększenia liczebności populacji północnego nosorożca białego, któremu grozi wyginiecie.

Wykorzystanie wspólne nowoczesnych metod biotechnicznych i genetycznych stwarza szansę na odtworzenie wymarłych już gatunków zwierząt, takich jak tur (*Bos primigenius*). Ostatnia samica tura padła w 1627 r. w Puszczy Jaktorowskiej (Słomski i in., 2008). Podejmowane są badania zmierzające do przywrócenia tego gatunku na pierwotne miejsce bytowania. Zachowany materiał genetyczny (DNA pozyskane z kości szkieletów turów, które są eksp-

natami muzealnymi) może posłużyć do jego klonowania. Podejmowane badania napotykają jednak na wiele ograniczeń, ponieważ materiału badawczego jest niewiele i nie jest on dobrze zachowany. Czynniki środowiskowe, takie jak: skład chemiczny gleby, pH, promieniowanie, zachodzące reakcje, grzyby, bakterie, oczyszczanie i konserwacja eksponatów wpływają niekorzystnie na strukturę materiału genetycznego, który najlepiej zachowany jest w kościach, zębach i mózgdzeniach (Słomski i in., 2008). Ponadto, należy znaleźć odpowiednią matkę zastępczą, która urodzi klonowane zwierzę i która najbardziej przypomina tura (*Bos primigenius*) pod względem genetycznym. W tym celu niezbędne jest wykazanie pokrewieństwa z innymi gatunkami oraz ustalenie podobieństw i różnic względem bydła domowego, a także poznanie przyczyn, które doprowadziły do wymarcia tego gatunku. Podobne badania przeprowadzono w Hiszpanii, gdzie wydobyto szczątki niedźwiedzia jaskiniowego (*Ursus spelaeus*), a pozyskane DNA także poddano sekwencjonowaniu (Dabney i in., 2013). Obecnie trwają badania zmierzające do przywrócenia wilka tasmańskiego (*Thylacinus cynocephalus*), którego ostatni przedstawiciel padł w 1936 r. w ogrodzie zoologicznym w Tasmanii (Miller i in., 2009).

W latach 80. i 90. XX w. podjęto ważne działania na rzecz ochrony ginących gatunków zwierząt. Stworzono Frozen Ark Project, którego celem było zachowanie materiału genetycznego zanim dojdzie do wymarcia gatunków (Benirschke, 1984; Benford, 1992; Holt i in., 1996; Clarke, 2008). Zgromadzony różnorodny materiał biologiczny zwierząt (komórki, tkanki, embriony, komórki jajowe, nasienie, próbki krwi oraz DNA) jest przechowywany w bankach zasobów genetycznych (GRB) (Holt i Pickard, 1999). Pozyskany materiał genetyczny można wykorzystać do transferu zarodków, IVF, AI i klonowania. Takich ośrodków badawczych na świecie powstało kilka. W Polsce w Instytucie Zootechniki PIB w Krakowie-Balicach również funkcjonuje Bank Materiałów Biologicznych, w którym jest przechowywany materiał genetyczny rodzimych ras zwierząt gospodarskich, objętych ochroną zasobów genetycznych. Również w Polsce powstała inicjatywa stworzenia Banku Genów dla zachowania populacji żubra (*Bison bonasus*). Zachowanie gatunku ma pole-

gać na pobieraniu nasienia *post mortem* i podawaniu go kriokonserwacji (Strucka, 2010; Kozdrowski i in., 2011). W przyszłości udoskonalanie techniki konserwacji nasienia żubra pozwoli na stworzenie banku nasienia.

Metodą, która również stwarza szansę na ochronę gatunku jest wprowadzenie zwierząt hybrydowych. Zwierzęta te przyciągają uwagę wybujałością różnych cech, można więc spotkać je w ogrodach zoologicznych, szczególnie są to przedstawiciele kotowatych. Kiedyś w Polsce hodowano żubronie (mieszance międzygatunkowe żubra i bydła domowego). Hodowla ta miała być innowacją w polskim rolnictwie. Zwierzęta te cechuje wytrzymałość, duża odporność na choroby i niekorzystne warunki środowiska.

*

Połączenie metod hodowlanych ze współczesnymi osiągnięciami nauki w dziedzinie biotechnologii stwarza możliwości odtworzenia wielu populacji poprzez kojarzenie wybranych osobników o pożądanym genotypie, a nie opieranie się wyłącznie na fenotypie. Ciekawym przykładem obrazującym zastosowanie obu metod jest przywracanie kwaggi (*Equus quagga quagga*). Terminem kwagga posługiwano się dość ogólnie. Nie precyzowano szczególnie w ówczesnym czasie, jaki to konkretnie gatunek. Nazwę tę stosowano dla większości zebr. W momencie, kiedy chciano to zmienić, aby ocalić gatunek, było już za późno. W 1883 r. w amsterdamskim ogrodzie zoologicznym padł ostatni przedstawiciel tego gatunku. Po upływie 100 lat zbadano DNA kwaggi (*Equus quagga quagga*) (Higuchi i in., 1984) dzięki zachowanym eksponatom muzealnym. W 1986 r. rozpoczęto Projekt Kwagga (The Quagga Project), którego głównym założeniem było wybranie odpowiednich zwierząt (Harley i in., 2009). Do projektu włączono zebrę (*Equus quagga*), które charakteryzowały się jak największą redukcją pasów i miały sierść delikatnie zabarwioną na brązowo, co przypominało nieco ubarwienie kwaggi (*Equus quagga quagga*). Ich pręgi na sierści były stosunkowo szerokie o zabarwieniu od czarnego, poprzez rudawobrązowe aż do brunatnego.

W ogrodach zoologicznych i muzeach na całym świecie zachowały się 23 skóry i kilka szkieletów. W ciągu wielu lat badań doczekano się potomstwa, które w kolejnych generacjach

coraz bardziej przypomina kwagę (*Equus quagga quagga*). Badania trwają nadal, obecnie badane jest DNA zachowanych kości i porównywane z materiałem genetycznym osobników biorą-

cych udział w projekcie (De Vos, 2014). Wiele wskazuje na to, że gatunek całkowicie powróci na pierwotne siedliska afrykańskie (Leonard i in., 2005).

Literatura

- Bavister B.D. (2002). Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction*, 124: 181–196.
- Benford G. (1992). Saving the library of life. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89: 11098–11101.
- Benirschke K. (1984). The frozen zoo concept. *Zoo. Biol.*, 3: 325–328.
- Berlinguer F., Leoni G.G., Bogliolo L., Bebbere D., Succu S., Rosati I., Ledda S., Naitana S. (2005). *In vivo* and *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved European mouflon [*Ovis gmelini musimon*] spermatozoa used to restore genetically rare and isolated populations. *Theriogenology*, 63: 902–911.
- Callaway E. (2016). Stem-cell plan aims to bring rhino back from brink of extinction. *Nature*, 533: 20–21.
- Clarke A.G. (2008). The Frozen Ark Project: the role of zoos and aquariums in preserving the genetic material of threatened animals. *Int. Zoo. Yb.*, 43: 222–230.
- Comizzoli P., Mermillod P., Maugé R. (2000). Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 40: 493–504.
- Dabney J., Knapp M., Glocke I., Gansauge M.T., Weihmann A., Nickel B., Valdiosera C., García N., Pääbo S., Arsuaga J.L., Meyer M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proc. PNAS*, 110.
- De Vos R. (2014). Stripes faded, barking silenced: Remembering quagga. *Anim. Studies J.*, 3: 29–45.
- Donoghue A.M., Johnston L.A., Seal U.S., Armstrong D.L., Simmons L.G., Gross T., Tilson R.L., Wildt D.E. (1992). Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 96: 555–564.
- Emslie R., Brooks M. (1999). African rhino: Status survey and action plan. IUCN, Gland, Switzerland.
- Emslie R.H., Lobao Tello J.L.P. (2006). Report on the different target species counted and evidence of poaching activity recorded during aerial surveys undertaken in Southern Garamba national park and adjoining Domaine de Chasse Gangala na Bodio, Democratic Republic of Congo. Kinshasa; ICCN / APF / AfRSG / UNESCO.
- Folch J., Cocero M.J., Chesné P., Alabart J.L., Domínguez V., Cognié Y., Roche A., Fernández-Arias A., Martí J.I., Sánchez P., Echegoyen E., Beckers J.F., Bonastre A.S., Vignon X. (2009). First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, 71: 1026–1034.
- Harley E.H., Knight M.H., Lardner C., Wooding B., Gregor M. (2009). The quagga project: progress over 20 years of selective breeding. *South Afr. J. Wildlife Res.*, 39: 155–163.
- Hemami M., Kaczensky P., Lkhagvasuren B., Pereladova O., Bouskila A. (2015). *Equus hemionus ssp. onager*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Hermes R., Göritz F., Saragusty J., Sós E., Molnar V., Reid C.E., Schwarzenberger F., Hildebrandt T.B. (2009). First successful artificial insemination with frozen-thawed semen in rhinoceros. *Theriogenology*, 71: 393–399.
- Herrick J.R., Campbell M., Levens G., Moore T., Benson K., D'Agostino J., West G., Okeson D.M., Coke R., Portacio S.C., Leiske K., Kreider C., Polumbo P.J., Swanson W.F. (2010). *In vitro* fertilization and sperm cryopreservation in the black-footed cat (*Felis nigripes*) and sand cat (*Felis margarita*). *Biol. Reprod.*, 82: 552–562.
- Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O.A., Wilson A.C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312: 282–284.
- Hill J.R., Roussel A.J., Cibelli J.B., Edwards J.F., Hooper N.L., Miller M.W., Thompson J.A., Looney C.R., Westhusin M.E., Robl J.M., Stice S.L. (1999). Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, 51: 1451–1465.
- Holt W.V., Pickard A.R. (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev. Reprod.*, 4: 143–150.
- Holt W.V., Moore H.D.M., North R.D., Hartman T.D., Hodges J.K. (1988). Hormonal and behavioural detection of oestrus in blackbuck, *Antelope cervicapra*, and successful artificial insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil.*, 82: 717–725.
- Holt W.V., Bennett P.M., Volobouev V., Watson P.F. (1996). Genetic resource banks in wildlife conservation. *J. Zool.*, 238: 531–544.
- IUCN and TRAFFIC (2012). African and Asian Rhinoceroses: status, conservation and trade. A report from the IUCN Species Survival Commission (IUCN/SSC).
- Kozdrowski R., Nizański W., Dubiel A., Olech W. (2011). Possibilities of using the European bison (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa collected post-mortem for cryopreservation and artificial insemina-

- tion: a pilot study. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 9: 31.
- Lanza R.P., Cibelli J.B., Diaz F., Moraes C.T., Farin P.W., Farin C.E., Hammer C.J., West M.D., Damiani P. (2000). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2.
- Lengwinat T., Blottner S. (1994). *In vitro* fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 35: 291–301.
- Leonard J.A., Rohland N., Glaberman S., Fleischer R.C., Caccone A., Hofreiter M. (2005). A rapid loss of stripes: the evolutionary history of the extinct quagga. *Biol. Lett.*, 1: 2915.
- Loi P., Ptak G., Barboni B., Fulka J.Jr., Cappai P., Clinton M., Emslie R.H., Reid C., Tello J. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, 19: 962–964.
- Luvoni G.C. (2006). Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66: 101–111.
- Miller W., Drautz D.I., Janecka J.E., Lesk A.M., Ratan A., Tomsho L.P., Packard M., Zhang Y., McClellan L.R., Qi J., Zhao F., Gilbert M.T., Dalén L., Arsuaga J.L., Ericson P.G., Huson D.H., Helgen K.M., Murphy W.J., Götherström A., Schuster S.C. (2009). The mitochondrial genome sequence of the Tasmanian tiger (*Thylacinus cynocephalus*). *Gen. Res.*, 19: 213–220.
- Modliński J.A., Karasiewicz J. (2001). Klonowanie somatyczne ssaków. *Medycyna Wieku Rozwojowego*, V, Supl. I do nr 1.
- Moore H.D.M., Bush M., Celma M., Garcia A.L., Hartman T.D., Hearn J.P., Hodges J.K., Jones D.M., Knight J.A., Monsalve L., Wildt D.E. (1984). Artificial insemination in the Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J. Zool.*, 203: 269–278.
- 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. (2008). Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology*, 70: 638–647.
- Okarma H., Śnieżko S., Olszańska A. (2002). Occurrence of wildcat in the Polish Carpathian Mountains. *Acta Theriol.*, 47: 499–504.
- Pope C.E., Dresser B.L., Chin N.W., Liu J.H., Loskutoff N.M., Behnke E.J., Brown C., McRae M.A., Sinoway C.E., Campbell M.K., Cameron K.N., Owens O.M., Johnson C.A., Evans R.R., Cedars M.I. (1997). Birth of a western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) following *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Am. J. Primatol.*, 41: 247–260.
- Schook M.W., Wildt D.E., Weiss R.B., Wolfé B.A., Archibald K.E., Pukazhenth B.S. (2013). Fundamental studies of the reproductive biology of the endangered Persian onager (*Equus hemionus onager*) result in first wild equid offspring from artificial insemination. *Biol. Reprod.*, 89: 1–13.
- Słomski R., Dzieduszycki A.M., Lipiński D., Szalata M., Zeyland J., Wielgus K., Frąckowiak H., Smorąg Z., Ryba M.S. (2008). Analiza DNA tura (*Bos primigenius*). *Nauka*, 4: 65–75.
- Strucka E. (red.) (2010). Ochrona *ex situ* żubra *Bison bonasus* w Polsce. Projekt realizowany w latach 2010–2013, SGGW, Warszawa.
- Thongtip N., Mahasawangkul S., Thitaram C., Pongsopavijitr P., Kornkaewrat K., Pinyopummin A., Angkawanih T., Jansittiwate S., Rungsri R., Boonprasert K., Wongkalasin W., Homkong P., Dejchaisri S., Wajjwalku W., Saikhun K. (2009). Successful artificial insemination in the Asian elephant (*Elephas maximus*) using chilled and frozen-thawed semen. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 7: 75.
- Wani N.A., Wernery U., Hassan F.A., Wernery R., Skidmore J.A. (2010). Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 82: 373–379.

SELECTED ASPECTS OF THE POTENTIAL USE OF ASSISTED REPRODUCTION METHODS IN THE CONSERVATION OF ENDANGERED MAMMAL SPECIES

Summary

Biotechnological methods of assisted reproduction such as artificial insemination, *in vitro* fertilization, embryo transfer and cloning are an indispensable part of research on reproduction. Particularly important is the use of these methods for the reintroduction of endangered species. The reserve of genetic material created in gene banks will increase the gene pool of endangered species. Research with the use of assisted reproduction technology creates an opportunity to restore extinct species, as exemplified by the attempts to restore the Pyrenean ibex (*Capra pyrenaica pyrenaica*). The biotechnological methods of assisted reproduction also serve to reintroduce endangered species to their original habitats, as shown by the efforts to restore quagga (*Equus quagga quagga*) to their original habitats.

Key words: insemination, endangered species, *in vitro* fertilization, cloning