

Sylwia Prochowska<sup>1</sup>, Wojciech Niżański<sup>1</sup>,  
Agnieszka Partyka<sup>1</sup>, Joanna Kochan<sup>2</sup>, Teresa Grega<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

<sup>2</sup>Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

<sup>3</sup>Ogród Zoologiczny w Krakowie

## ROLA KRIOKONSERWACJI GAMET, ZARODKÓW I TKANEK W OCHRONIE ZASOBÓW GENETYCZNYCH POPULACJI NA PRZYKŁADZIE DZIKICH KOTOWATYCH

### Streszczenie

W dobie zanikającej bioróżnorodności flory i fauny zachowanie zasobów genetycznych roślin i zwierząt jest ważnym problemem jaki stawia przed nami współczesny świat. Jedną z metod ochrony *ex situ* jest tworzenie banków komórek i tkanek. Kriokonserwacja gamet, zarodków oraz fragmentów tkanek jajnikowej czy jądrowej stanowi niezwykle cenne narzędzie w programach ochrony zagrożonych gatunków czy ras. Szczególnie istotna jest możliwość poddania procesowi mrożenia komórek i tkanek pobranych już po śmierci zwierzęcia, co zapobiega bezpowrotnej utracie genów danego osobnika i pozwala na zachowywanie puli genetycznej ginącej populacji. W artykule został opisany przypadek pośmiertnego pozyskania i kriokonserwacji nasienia ocelota.

**Słowa kluczowe:** kriokonserwacja, nasienie, dzikie kotowate, ocelot

### Wstęp

Różnorodność biologiczna (bioróżnorodność) to zróżnicowanie wszystkich żywych organizmów występujących na Ziemi w ekosystemach lądowych, morskich i słodkowodnych oraz w zespołach ekologicznych, których są częścią [Konwencja o różnorodności biologicznej 1992]. Pojęcie to jest bardzo szerokie, obejmujące swoim znaczeniem zarówno istnienie jak największej ilości gatunków i zróżnicowanych systemów ekologicznych na danym obszarze, ale także różnorodność genetyczną, czyli obecność w danej populacji jak największej liczby różniących się między sobą genów i ich kombinacji. Wskutek rozwoju cywilizacji i postępu technicznego omawiana różnorodność biologiczna drastycznie się zmniejsza. Zgodnie z Edycją Czerwonej Księgi z roku 2011, ponad 19 tysięcy gatunków na całym świecie jest zagrożonych wyginieciem [IUCN 2011]. Głównymi zagrożeniami są w pierwszej kolejności zmiany środowiska (głównie przez powiększanie obszarów przeznaczonych pod uprawę oraz budowę miast i dróg) oraz wprowadzanie do środowiska gatunków i ras preferowanych przez człowieka [Gajda i Smorąg 2007]. To ostatnie postawiło w sytuacji zagrożenia bioróżnorodność zwierząt gospodarskich: lokalne, mało wydajne rasy są wypierane przez rasy wysokoprodukcyjne [Martyniuk 2010]. Według danych FAO, 690 ras zwierząt gospodarskich już wyginęło, a około 20% ras w świecie jest zagrożonych wyginieciem

[Martyniuk 2010]. Także rasy nie będące w krytycznej sytuacji mogą cierpieć w wyniku małego zróżnicowania genetycznego, będącego następstwem dryfu genetycznego i wysokiego stopnia inbrodu [Woelders i in. 2012].

W tej sytuacji nie ulega wątpliwości, że prowadzenie programów ochrony gatunków i ras zagrożonych wyginięciem jest niezbędne. Ochrona ta może być realizowana metodami *in situ*, czyli w miejscu, gdzie dany gatunek występuje naturalnie, lub metodami *ex situ* - w specjalistycznych ośrodkach (np. w rezerwatach czy ogrodach zoologicznych), gdzie w pewnym zakresie wykorzystywane są metody biotechnologii rozrodu [Gajda i Smorąg 2007]. Metody *ex situ*, obok utrzymywania i hodowli żywych zwierząt poza ich naturalnym środowiskiem, obejmują także zachowanie materiału genetycznego poza organizmem zwierzęcia, przeważnie w postaci banków komórek lub tkanek. I chociaż ochrona środowiska naturalnego i istniejących na danym terenie populacji wydaje się najważniejsza i umożliwia prowadzenie działań w najszerszej skali, często nie jest ona wystarczająca. Mało liczne populacje czy gatunki „wskrzeszone” z zaledwie kilku osobników charakteryzują się wysokim stopniem inbrodu, który może odpowiadać za obniżoną zdrowotność i płodność takich zwierząt, a dodatkowo naraża odrestaurowane populacje na zagrożenia w przyszłości [Holt 2008]. W tym kontekście niezwykle ważne jest, aby skupić się na zachowaniu jak najszerszej puli genowej populacji [Holt 2008], m. in. poprzez tworzenie banków materiału genetycznego. Przykładem takiego projektu jest „The Frozen Ark”, założony w 1996 roku przez konsorcjum naukowców w Londynie [Williams 2004]. Nawiązując do biblijnej Arki Noego, program ma na celu stworzenie bazy DNA i komórek tysięcy gatunków zagrożonych wyginięciem. Zakonserwowany w ten sposób materiał ma być zabezpieczeniem na wypadek, gdyby pomimo wysiłków naukowców danego gatunku nie udałooby się uratować i jednocześnie może być on jedynym punktem wyjścia do odtworzenia wymarłej populacji [Williams 2004].

Konserwacja komórek i tkanek tradycyjnymi sposobami – w formalinie czy alkoholu – nie pozwala na ich późniejsze zastosowanie w odtwarzaniu liczebności populacji czy wzbogacaniu jej zasobów genetycznych. Tworzenie funkcjonalnych banków genów możliwe jest jedynie dzięki zastosowaniu kriokonserwacji [Lermen 2009]. Mianem tym określanym jest proces zamrażania oraz przechowywania komórek i tkanek w temperaturach poniżej  $-80^{\circ}\text{C}$  [Baust i in. 2009], najczęściej w ciekłym azocie ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). W takich warunkach zahamowaniu ulega wszelka aktywność metaboliczna, a zakonserwowane komórki mogą być przechowywane w niezmiennym stanie praktycznie nieograniczenie. Dzięki temu możliwe jest rozdzielanie w czasie i przestrzeni pobrania komórek (np. plemników czy oocytów) oraz ich wykorzystania (np. do sztucznej inseminacji czy zapłodnienia *in-vitro*). W praktyce umożliwia to wymianę materiału genetycznego pomiędzy oddalonymi od siebie placówkami, bez konieczności transportu żywego zwierzęcia i narażania go na stres transportowy, który może odbić się negatywnie na jego zdrowiu i płodności. Z kolei możliwość przechowywania komórek i tkanek przez dowolnie długi czas oznacza, że materiał pobrany za życia danego osobnika może być wykorzystywany nawet wiele lat po jego śmierci. Co więcej, możliwe jest także pośmiertne pozyskanie i kriokonserwacja komórek oraz tkanek, co ma szczególne znaczenie w utrzymaniu zasobów genetycznych, gdyż pozwala na zachowanie genów danego osobnika, które w innym przypadku byłyby bezpowrotnie stracone.

Jedną z grup zwierząt, których bioróżnorodność jest skrajnie zagrożona, są dzikie kotowate. Spośród 37 przedstawicieli rodziny Felidae, wszystkie gatunki za wyjątkiem kota domowego są zagrożone wyginięciem na części lub całym obszarze swojego występowania [Niżański i in. 2010]. Jedną z przyczyn tej rozpaczliwej sytuacji jest, obok wspomnianego kurczenia się naturalnych siedlisk, między innymi kosztem terenów uprawnych, także kłusownictwo oraz działania odwetowe za ataki na ludzi i żywy inwentarz. Dużą rolę odgrywa także zanikanie zwierząt stanowiących bazę pokarmową drapieżników, jak ma to miejsce na przykład w przypadku rysia iberyjskiego (*Lynx pardinus*) żywiącego się głównie królikiem europejskim (*Oryctolagus cuniculus*) [Palomares 2011]. Zmniejszająca się liczebność populacji oraz jej fragmentacja na małe, izolowane grupy, pomiędzy którymi przepływ genów jest znacznie utrudniony, stanowi poważne zagrożenie zasobów genetycznych danego gatunku. Wspomniany ryś iberyjski jest tu przykładem skrajnym, bowiem na wolności pozostały jedynie 2 izolowane populacje tego gatunku, obejmujące łącznie około 200 osobników [Palomares i in. 2011], przejawiające wyjątkowo niskie zróżnicowanie genetyczne [Casas-Marce i in. 2013]. W przypadku takich nielicznych grup, upadek nawet jednego osobnika przekłada się na poważne uszczuplenie i tak już bardzo wąskiej puli genowej. Możliwość pobrania materiału po śmierci stanowi tu niezwykle cenne narzędzie w ratowaniu różnorodności genetycznej gatunku.

Poniżej przedstawiony zostanie przypadek pośmiertnego pozyskania i kriokonserwacji nasienia ocelota, z wykorzystaniem protokołu opracowanego dla kota domowego.

### Opis przypadku

Dziesięcioletni samiec ocelota padł w krakowskim ogrodzie zoologicznym z powodu ropnego zakażenia narządów wewnętrznych. Podczas sekcji pobrano jądra wraz z najądrzami, które to narządy następnie przetransportowano w możliwie najszybszy sposób do pracowni andrologicznej Katedry Rozrodu we Wrocławiu. Natychmiast po dostarczeniu do laboratorium najądrza zostały odpreparowane od jąder, oczyszczone z krwi i tkanek otaczających, a następnie ponacinane w buforze TRIS w celu pozyskania nasienia zgodnie z metodyką opisaną w literaturze dla kota domowego [Siemienuch i Wocławek-Potocka 2008]. Pozyskane nasienie zostało poddane ocenie makroskopowej (objętość mierzona pipetą automatyczną) oraz podstawowej ocenie mikroskopowej. Oceniono ruchliwość subiektywną (mikroskop kontrastowo-fazowy, pow. 200x), koncentrację (przy użyciu komory Thoma), żywotność (preparaty barwione eozyną i nigrozyną) oraz morfologię plemników (preparaty barwione metodą Giemsy wg Watsona). Udało się pozyskać 2,7 ml zawiesiny plemników o koncentracji  $455 \times 10^6/\text{ml}$  i ruchliwości subiektywnej 40%. Barwienie eozyną-nigrozyną wykazało 63% plemników żywych. Jedynie 33,5% plemników zostało zaklasyfikowanych jako morfologicznie prawidłowe. Pomimo słabej ruchliwości i morfologii plemników, została podjęta próba kriokonserwacji nasienia.

Nasienie przechowano przez noc w temp. 5°C w rozrzedzalniku opartym na buforze TRIS z dodatkiem 20% żółtka jaja kurzego, stosowanym do konserwacji nasienia w stanie płynnym. Następnego dnia rano nasienie odwiro-

wano i zawieszono w rozrzedzalniku z dodatkiem 6% glicerolu i 1% Equex STM (środek powierzchniowo czynny), a po półtoragodzinnej ekwilibracji w temp. 5°C przeniesiono do słomek 0,5 ml oraz 0,25 ml i poddano procedurze kriokonserwacji w parach ciekłego azotu (5 cm nad lustrem ciekłego azotu) przed 10 minut, zgodnie z procedurą stosowaną w naszym laboratorium dla kota domowego [Nizański i in. 2005]. Po tym czasie słomki z nasieniem zanurzono w ciekłym azocie i przeniesiono do Banku Nasienia w celu długoterminowego przechowywania. W przyszłości zamrożone nasienie ma zostać wykorzystane do zapłodnienia in-vitro lub sztucznej inseminacji.

Ze względu na widoczny początkowy etap rozkładu mięszu jąder, odstąpiono od próby kriokonserwacji tkanki jądrowej.

## Omówienie

W niniejszym artykule zastosowanie kriokonserwacji opisano na przykładzie dzikich kotowatych, jednak technika ta stosowana jest, na znacznie szerszą skalę, u zwierząt gospodarskich. W szczególności dotyczy to bydła, u którego inseminacja nasieniem mrożonym jest stosowana rutynowo i obejmuje ok.  $\frac{3}{4}$  światowego pogłowia, pozwalając na znaczące przyśpieszenie postępu hodowlanego. Skala stosowania sztucznego unasieniania u pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich, tj. owiec, świń, koni, a także królików jest nieporównanie mniejsza [Gajda i Smorąg 2007]. Wynika to z faktu, że u większości gatunków, nasienie po procesie mrożenia-rozmrożenia charakteryzuje się obniżoną zdolnością zapładniającą [Barbas 2009]. Intensywne badania nad optymalizacją metod i protokołów mrożenia nasienia pozwalają mieć nadzieję, że sytuacja ta ulegnie zmianie. Oprócz wspomnianego zastosowania przemysłowego, kriokonserwacja znajduje zastosowanie w zachowywaniu zasobów genetycznych rzadkich ras bydła, owiec, kóz i świń [Barbas 2009]. Należy dodać, że w kilku krajach Europy zachodniej, np. Francji, Holandii i Czechach, w bankach genów gromadzony jest nie tylko materiał pochodzący od zagrożonych ras rodzimych, ale także materiał od ras wysokowydajnych w celu zabezpieczenia ich zmienności, która na skutek intensywnej selekcji coraz bardziej się wyczerpuje [Martyniuk 2010]. Narodowe Banki Genów, w których przechowywane jest nasienie, oocyty i zarodki pobrane od ras charakterystycznych dla danego regionu czy kraju powstały i są rozwijane w wielu państwach, m. in. w Portugalii [Barbas 2009] czy Holandii [Woelders i in. 2012]. W Polsce, pomimo programów ochrony zagrożonych zasobów genetycznych zwierząt w rolnictwie oraz gromadzenia nasienia i zarodków w kilku ośrodkach, nie ma Krajowego Banku Genów Zwierząt [Martyniuk 2010].

W przeciwieństwie do zwierząt gospodarskich, u których osiągnięte wyniki są bardzo dobre, rezultaty u kotowatych oraz wielu innych dzikich zwierząt wciąż są niezadowalające, pomimo ich kluczowego znaczenia w ratowaniu ginących gatunków. Spowodowane jest to brakiem podstawowej wiedzy o fizjologii rozrodu i właściwościach gamet dziko żyjących gatunków, które to deficyty wynikają z ograniczonych możliwości studiowania biologii rozrodu zwierząt dzikich, szczególnie tych rzadko występujących [Holt 2008]. Istnienie gatunkowo swoistych różnic w podatności komórek na zamrażanie wymaga opracowania i zastosowania specyficznych procedur dla każdego gatunku z osobna, jednak jak zauważył Comizzoli: „Kiedy rzadkie zwierzę



niespodziewanie ginie, nie ma czasu na rozumienie fundamentalnych zasad biofizyki. W takich nagłych przypadkach, należy polegać na doświadczeniu oraz informacjach dostępnych dla spokrewnionych taksonomicznie gatunków” [Comizzoli i in. 2012]. Wielu naukowców prowadzących badania nad zastosowaniem biotechnik rozrodu u kota domowego podkreśla ich znaczenie aplikacyjne w ratowaniu dzikich kotowatych [Niżański i in. 2010]. Sprawdziło się w opisanym przypadku, w którym potwierdzona została przydatność protokołu opracowanego dla blisko spokrewnionego gatunku – kota domowego. W literaturze mało jest informacji odnośnie pozyskania i mrożenia nasienia ocelota, dodatkowo wszystkie dotyczą nasienia pozyskanego eksperymentalnie poprzez elektro ejakulację [Stoops i in. 2007], co czyni opisany przez nas przypadek wyjątkowym.

W przedstawionym przypadku pobrano nasienie poprzez nacinanie ogonów najądrzy. Ze względu na możliwość tylko jednokrotnego wykorzystania tej techniki w życiu danego samca nie nadaje się ona do rutynowego wykorzystania u zwierząt hodowlanych. Stosowana może być jednak z powodzeniem u zwierząt dzikich i wybitnych reproduktorów, w celu stworzenia rezerwy genetycznej samców padłych lub skierowanych do kastracji z przyczyn zdrowotnych czy behawioralnych. W tym zakresie jest ona niezwykle cenną metodą biotechniczną i będzie prawdopodobnie wykorzystywana w dalszym ciągu w dużym zakresie w odniesieniu do tej grupy zwierząt [Niżański i in. 2010]. W warunkach terenowych nie zawsze istnieje możliwość pozyskania nasienia od padłego osobnika. Na szczęście możliwe jest poddanie kriokonserwacji plemników przechowywanych w najądrzach do 24 godz. od śmierci zwierzęcia [Chatdarong i in. 2009], jak w opisanym przez nas przypadku. W sytuacji gdy od śmierci zwierzęcia do pozyskania gamet mija dłuższy okres (24-60 godz.) często nie udaje się uzyskać żywych komórek [Leon-Quinto i in. 2009]. Ruchliwość otrzymanego przez nas nasienia nie była zadowalająca, jednak nawet w przypadku bardzo słabej ruchliwości lub zupełnego jej braku warto podjąć próbę kriokonserwacji, gdyż techniki takie jak ICSI (intracytoplasmic sperm injection, bezpośrednie wstrzyknięcie plemnika do oocytu) pozwalają na ominięcie tej przeszkody i wykorzystanie takiego nasienia do produkcji zarodków [Leon-Quinto i in. 2009].

W artykule został przedstawiony przykład zastosowania mrożenia nasienia do ratowania genów padłego samca, jednak technika kriokonserwacji może zostać zastosowana do praktycznie każdego rodzaju komórek czy nawet całych tkanek. Obok plemników, kriokonserwacji poddaje się także zarodki, oocyty, fragmenty tkanki jajnikowej i jądrowej, a także komórki somatyczne w różnych postaciach (bioptaty skóry, krew, wyrwane włosy, wymazy z policzków i inne) [Leon-Quinto 2009]. Pomimo szerokiej możliwości wydaje się, że mrożenie nasienia prawdopodobnie będzie najszerzej stosowane, z kilku powodów. Po pierwsze, nasienie jest relatywnie łatwe do pozyskania, a dla większości gatunków (szczególnie zwierząt gospodarskich) istnieją opracowane odpowiednie protokoły kriokonserwacji plemników, zapewniające ich dobrą przeżywalność. Również późniejsze wykorzystanie do sztucznej inseminacji jest względnie łatwe i tanie do przeprowadzenia, zwłaszcza u gatunków, u których jest ona stosowana rutynowo (bydło, owce) [Woelders i in. 2012]. Według Leon-Quinto [Leon-Quinto 2009] nasienie musi być głównym i podstawowym materiałem przechowywanym w bankach zasobów genetycznych.

W następnej kolejności najczęściej mrożeniu poddawane są zarodki. Są one istotne w kontekście zachowywania zasobów genetycznych, gdyż pozwalają na szybkie odnowienie zanikającej populacji [Woelders i in. 2012]. Niestety, u większości gatunków kriokonserwacja zarodków nie jest stosowana rutynowo i brak jest opracowanych procedur. Podobnie sytuacja wygląda w przypadku oocytów. Dodatkowo, ze względu na specyficzną budowę komórki jajowej, jej konserwacja w ciekłym azocie stanowi duże wyzwanie. Zastosowanie witrifikacji zamiast wolnego mrożenia oraz opracowanie specyficznych dla danego gatunku roztworów witrifikacyjnych pozwoliło na odniesienie sukcesu w tej dziedzinie u wielu gatunków.

Kriokonserwacja tkanki jądrowej i jajnikowej stanowi alternatywę i/lub dopełnienie mrożenia oocytów i embrionów. Pozwala na zachowanie materiału genetycznego od niedojrzałych płciowo osobników [Leon-Quinto i in. 2009], zaś u dorosłych zwierząt stanowi źródło wielkiej ilości gamet na różnym stopniu rozwoju i różnicowania. Zakonserwowana w niskich temperaturach tkanka jest następnie przeszczepiana do organizmu biorcy (ksenotransplantacja) lub dojrzałe komórki rozrodcze są pozyskiwane w warunkach hodowli *in vitro* [Luvoni 2006]. Należy tu jednak mieć na uwadze, że łatwiej poddawać kriokonserwacji komórki niż tkanki. Wynika to z faktu, że różne rodzaje komórek charakteryzują się różną podatnością na kriouszkodzenia i wymagają specyficznych warunków zamrażania. Dodatkowo, połączenia między komórkami muszą pozostać nie naruszone, żeby zachować integralność tkanki po rozmrożeniu [Luvoni 2006]. Z drugiej strony, w przypadku tkanki jajnikowej dowiedziono, że oocyty we wczesnych stadiach rozwoju są mniej podatne na kriouszkodzenia niż dojrzałe komórki jajowe, co czyni je łatwiejsze do zamrożenia [Luvoni 2006]. Kriokonserwacja i późniejsze wykorzystanie tkanki gonadalnej pozostaje na razie w fazie eksperymentalnej, ale intensywne badania prowadzone w tej dziedzinie pozwalają sądzić, że w przyszłości nabierze to większego znaczenia.

Duże nadzieje wiąże się z kriokonserwacją komórek somatycznych. Są one najłatwiejsze do pozyskania oraz zamrażania – nie wymagają skomplikowanych procedur ani sprzętu [Woelders i in. 2012], dodatkowo pozwalają na przeprowadzenie wielu badań genetycznych, toksykologicznych, filogenetycznych, epidemiologicznych i innych [Leon-Quinto i in. 2009]. Niestety ich zastosowanie w przywracaniu bioróżnorodności populacji jest już znacznie bardziej wymagające. Uzyskanie zarodków z wykorzystaniem komórek somatycznych możliwe jest po zastosowaniu transferu jądrowego, popularnie znanego pod nazwą „klonowania”. Cały proces obejmuje namnażanie komórek po rozmrożeniu, pozyskanie oocytów (od samicy tego samego gatunku lub blisko spokrewnionego) i ich dojrzewanie *in vitro*, zastąpienie jądra komórki jajowej jądrem komórki somatycznej, następnie hodowlę *in vitro* i przeszczep wyhodowanych w ten sposób zarodków do macicy biorczyni tego samego lub blisko spokrewnionego gatunku [Woelders i in. 2012]. Jest to pracochłonne i kosztowne, dodatkowo na dzień dzisiejszy charakteryzuje się małą wydajnością. Niemniej jednak udało się uzyskać w ten sposób żywe potomstwo u wielu gatunków, w tym od zwierząt dzikich [Gajda i Smorąg 2007], co czyni tę technikę obiecującą do zastosowania w przyszłości.

Doskonałą ilustracją zastosowania kriokonserwacji gamet i zarodków w połączeniu z biotechnikami rozrodu jest przypadek opisany przez Pope [Pope 2014]. W 2003 roku pobrano i zakonserwowano w ciekłym azocie

nasienie samca kota czarnołapego (*Felis nigripes*). Dwa lata później, w 2005 roku nasienie to rozmrożono i użyto do zapłodnienia in vitro. Wyhodowane w ten sposób zarodki poddano procedurze kriokonserwacji. Siedem lat później, w 2012 roku zarodki te rozmrożono, a następnie implantowano w macicy kotki domowej (*Felis catus domesticus*), która donosiła ciążę i urodziła kocię kota czarnołapego.

Autorzy artykułu mają nadzieję, że dzięki zastosowaniu biotechnik rozrodu opisany samiec ocelota również doczeka się w przyszłości potomstwa i jego geny przyczynią się do utrzymania różnorodności genetycznej tego gatunku.

## Podsumowanie

Omówiony przypadek pokazuje, że techniki wspomaganego rozrodu, powszechnie stosowane u zwierząt hodowlanych, mogą zostać wykorzystane w programach ochrony dzikich kotowatych. Pośmiertne pobieranie plemników i ich kriokonserwacja pozwala zachować geny cennych osobników, tym samym przyczyniając się do utrzymania puli genetycznej kurczących się populacji. Możliwość zastosowania mrożonego nasienia do sztucznej inseminacji lub zapłodnienia in vitro i embriotransferu stanowi potężne narzędzie w ratowaniu ginących gatunków, a nawet, w przyszłości, daje możliwość odtworzenia gatunku po jego wymarciu.

## Piśmiennictwo

1. Barbas J. P., Mascarenhas R. D., 2009: Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.*, 10(1): 49-62.
2. Baust J. G., Gao D., Baust J. M., 2009: Cryopreservation. An emerging paradigm change. *Organogenesis*, 5: 90-96.
3. Casas-Marce M., Soriano L., López-Bao J. V., Godoy J. A., 2013: Genetics at the verge of extinction: insights from the Iberian lynx. *Mol Ecol.*, 22(22): 5503-15.
4. Chatdarong K., Thuwanut p., Suksamai p., Patanatiradaj S., Sangwornrachasup A., 2009: Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides. *Reprod Dom Anim.*, 44 (Suppl. 2): 377-380.
5. Comizzoli P., Songsasen N., Hagedorn M., Wildt D.E., 2012: Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. *Theriogenology*, 78: 1666-1681.
6. Gajda B., Smoraż Z., 2007: Wykorzystanie metod biotechnologii rozrodu w zachowaniu bioróżnorodności zwierząt. *Biotechnologia*, 4(79): 55-65.
7. Holt W. V., 2008: Cryobiology, wildlife conservation & reality. *CryoLetters* 29(1): 43-52.
8. IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/search> [dostęp 13 czerwca 2014].
9. Konwencja o Różnorodności Biologicznej. Dz.U. 2002 nr 184 poz. 1532. <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20021841532> [dostęp 13 czerwca 2014].

10. Leon-Quinto T., Simon M. A., Cadenas R., Jones J., Martinez-Hernandez F. J., Moreno J. M., Vargas A., Martinez F., Soria B., 2009: Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Anim Reprod Sci.*, 112(3-4): 347-61.
11. Luvoni G. C., 2006: Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66: 101-11.
12. Martyniuk E., 2010: Ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich. Drukarnia „Pasaż” sp. z o.o.: 5.
13. Nizański W., Dejneka G. J., Klimowicz M., Dubiel A., 2005: Evaluating some properties of domestic cat epididymal spermatozoa and their cryopreservation. *Med. Weter.*, 61 (2), 173-178.
14. Nizański W., Mikołajewska N., Partyka A., Ochota M., 2010: Biotechniki w rozrodzie kotowatych - stan wiedzy, perspektywy i wyzwania. *Med. Weter.*, 68 (9): 529-533.
15. Palomares F, Rodríguez A, Revilla E, López-Bao JV, Calzada J., 2011: Assessment of the conservation efforts to prevent extinction of the Iberian lynx. *Conserv Biol.*, 25(1):4-8.
16. Pope C. E., 2014: Aspects of in vivo oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. *Theriogenology*, 81: 126-137.
17. Siemieniuch M., Woclawek-Potocka I., 2008: Assessment of selected quality parameters of epididymal cat (*Felis catus s.domestica*, L. 1758) sperm using flow cytometry method and computer assisted sperm analyser. *Reprod Dom Anim.*, 43: 633-637.
18. Stoops M., Bond J., Bateman H., Campbell M., Levens G., Bowsher T., Ferrell S., F. Swanson W., 2007: Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous *in vitro* fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Reprod. Fert. Dev.*, 19(5): 685-694.
19. Williams N., 2004: Frozen ark to hold samples of endangered species. *Curr. Biol.*, 14(16): 638-9.
20. Woelders H., Windig J., Hiemstra S. J., 2012: How Developments in Cryobiology, Reproductive Technologies and Conservation Genomics Could Shape Gene Banking Strategies for (Farm) Animals. *Reprod Dom Anim.*, 47: 264-73.