

# PERKEMBANGAN *in vitro* DAN *in vivo* EMBRIO MENCIT TANPA ZONA PELLUSIDA

*In vitro* AND *in vivo* DEVELOPMENT OF ZONA PELLUCIDA-FREE MOUSE EMBRYOS

Kusdiantoro Mohamad<sup>1</sup>, Kartini Eriani<sup>2</sup>, Ita Djuwita<sup>1</sup>, Arief Boediono<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Embriologi, Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Taman Kencana 3 Bogor 16151 INDONESIA, e-mail: anafkh@bogor.wasantara.net.id

<sup>2</sup>Laboratorium Histologi-Embriologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Syiah Kuala, Darussalam, Banda Aceh 23111, INDONESIA

## ABSTRAK

*Media Veteriner*. 1999. 6(2): 1-4

Penelitian ini bertujuan untuk melihat perkembangan embrio mencit tanpa zona pelusida pada pembiakan *in vitro* dan keberhasilan implantasi setelah dipindahkan ke rahim induk penerima. Embrio dipanen pada hari ke-4 (H-4) kebuntingan (H-1= hari saat sumbat vagina terlihat) dan zona pelusida dihilangkan dengan menggunakan pronase 0,25% selama 4-5 menit. Embrio dibiakkan dalam media biakan *tissue culture medium* 199 (TCM 199) yang diimbui albumin serum sapi (*bovine serum albumin*, BSA) 0,4% dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C selama lima jam. Tidak diperoleh perbedaan antara blastosis utuh (dengan zona pelusida) dan tanpa zona pelusida dalam perkembangannya menjadi blastosis ekspan, yaitu masing-masing 76% (31/41) dan 73% (43/59). Sebaliknya terdapat perbedaan morula utuh dan tanpa zona pelusida yang berkembang menjadi blastosis, yaitu masing-masing 79% (49/62) dan 19% (10/52). Hasil pemindahan embrio menunjukkan 48% (12/25) dari blastosis utuh dan 13% (6/45) dari blastosis tanpa zona pelusida yang dipindahkan berhasil mengalami implantasi dan 100% (3/3) induk penerima yang mendapatkan blastosis utuh serta 67% (4/6) induk penerima yang mendapatkan blastosis tanpa zona pelusida berhasil bunting pada pemeriksaan H-10 kebuntingan. Hasil ini menunjukkan bahwa embrio tanpa zona pelusida mampu berkembang secara *in vitro* maupun *in vivo*.

**Kata-kata kunci:** embrio tanpa zona pelusida, pembiakan *in vitro*, implantasi, mencit

## ABSTRACT

*Media Veteriner*. 1999. 6(2): 1-4

The aim of this study was to examine the *in vitro* and *in vivo* development of zona pellucida-free mouse embryos transferred to the recipient. Embryos were flushed on 4 days of gestation (vaginal plug = 1 day of gestation) and pellucida zona was removed by using 0.25% pronase for 4-5 min. Embryo were cultured in tissue culture medium (TCM) 199 supplemented with 0.4% bovine serum albumin (BSA) in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C for 5 h. There was no difference

between zona pellucida-intact and zona pellucida-free blastocysts developed into expanded blastocysts (76%, 31/41 and 73%, 43/59 for zona pellucida-intact and zona pellucida-free blastocysts, respectively). In contrast, zona pellucida-intact morula developed to blastocysts better than zona pellucida-free morula (79%, 49/62 and 19%, 10/52 for zona pellucida-intact and zona pellucida-free morula, respectively). The transfer of zona pellucida-intact blastocysts and zona pellucida-free blastocysts resulted in completely implantation (48%, 12/25 and 13%, 6/45 for zona pellucida-intact blastocysts and zona pellucida-free blastocysts, respectively). All animals (100%, 3/3) received zona pellucida-intact blastocysts got in pregnancy at the 10<sup>th</sup> days of gestation compared to those received zona pellucida-free blastocysts (67%, 4/6). These results demonstrate that zona pellucida-free embryos could develop both *in vitro* and *in vivo*.

**Key words:** zona pellucida-free embryo, *in vitro* culture, implantation, mouse

## PENDAHULUAN

Zona pelusida, suatu selubung glikoprotein yang membungkus sel telur mamalia, dibentuk selama proses folikulogenesis di dalam ovarium. Selain berfungsi dalam proses pembuahan dan pencegahan polispermia, zona pelusida juga berfungsi melindungi sel telur, menjaga keutuhan sel-sel blastomer dan mencegah terjadinya implantasi dini pada awal perkembangan embrio (Wassarman, 1990; Hafez *et al.*, 1993; Edwards dan Brody, 1995). Perkembangan teknik manipulasi dan rekayasa embrio melalui pembuahan mikro (*microfertilization*) untuk membantu pembuahan *in vitro* dan implantasi (Keefer, 1990; Fishel dan Symonds, 1993), penyayatan embrio untuk pembuatan kembar identik (Kippax *et al.*, 1991; Gray *et al.*, 1991; Vivanco *et al.*, 1991; de Armas *et al.*, 1992), agregasi embrio untuk pembuatan hewan kimera (Boediono *et al.*, 1993), dan biopsi sel-sel embrio untuk penentuan jenis kelamin atau pemeriksaan kelainan kromosom (Herr dan Reed, 1991; Edwards dan Brody, 1995) akan menyebabkan kerusakan sebagian atau bahkan seluruh zona pelusida.

Pada awalnya terdapat kekhawatiran bahwa embrio yang tidak memiliki zona pelusida akan mengalami gang-

guan perkembangan sehingga para ahli berusaha memasukkan kembali embrio hasil manipulasi ke dalam zona pelusida kosong. Perkembangan selanjutnya menunjukkan bahwa embrio tanpa zona pelusida mampu berkembang dalam pembiakan *in vitro* dan berhasil mengalami implantasi setelah dipindahkan ke induk penerima (Tan *et al.*, 1991; Tao *et al.*, 1991; de Armas *et al.*, 1992; Boediono *et al.* 1993; Fong *et al.*, 1997).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perkembangan *in vitro* dan *in vivo* embrio mencit tanpa zona pelusida dilihat dari perkembangannya di dalam media biakan *in vitro* dan keberhasilan implantasi setelah dipindahkan ke dalam rahim induk penerima.

## BAHAN DAN METODE

### Hewan Percobaan

Mencit betina galur DDY (umur 2-3 bulan) disuperovulasi dengan penyuntikan hormon *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG, Folligon, Intervet) 5 IU per ekor secara intraperitoneal (*i.p.*) dan 48 jam kemudian diikuti dengan penyuntikan hormon *human chorionic gonadotropin* (hCG, Chorulon, Intervet) 5 IU per ekor *i.p.* Kemudian mencit betina tersebut dikawinkan dengan pejantan (umur > 3 bulan) dari galur yang sama dengan perbandingan jantan:betina adalah 1:1 (*single mating*). Sehari kemudian dilakukan pemeriksaan sumbat vagina (*vaginal plug*) yang menunjukkan hewan telah kawin. Induk yang positif sumbat vagina disiapkan sebagai donor embrio. Hari terlihatnya sumbat vagina ditetapkan sebagai hari pertama (H-1) kebuntingan.

Induk penerima disiapkan dengan cara yang sama dengan persiapan induk donor, tetapi tanpa perlakuan superovulasi dan pejantan yang digunakan adalah pejantan vasektomi (pejantan yang telah mengalami pemotongan vas deferens untuk keperluan sterilisasi tanpa menghilangkan libido). Perkawinan tetap terjadi walaupun tidak diikuti oleh pembuahan, sehingga dihasilkan kebuntingan semu. Hewan yang positif sumbat vagina dari perkawinan dengan pejantan vasektomi ini dijadikan sebagai induk penerima untuk pemindahan embrio.

### Panen dan Pembiakan Embrio *In Vitro*

Induk donor dimatikan secara *dislocatio cervicalis* pada H-4 kebuntingan. Kemudian rahim bagian kornua uteri diambil dan dibilas dengan larutan garam penyangga (*phosphate buffered saline*, PBS, Gibco) yang diimbui albumin serum sapi (*bovine serum albumin*, BSA, Gibco) 0,3%. Embrio yang diperoleh sebagian dihilangkan zona pelusidanya dengan menggunakan pronase 0,25% dalam PBS selama 4-5 menit dan sebagian lagi yang masih memiliki zona pelusida yang utuh digunakan sebagai kontrol. Kedua kelompok embrio ini dibiakkan dalam media biakan *tissue culture medium* 199 (TCM 199, Sigma) yang diimbui dengan BSA 0,4% dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C selama lima jam. Ulangan dilakukan sebanyak 3-4 kali dengan jumlah embrio berkisar 10-20 embrio untuk setiap ulangan.

### Pemindahan Embrio

Induk penerima dengan umur kebuntingan yang sama dengan induk donor disuntik dengan xylazin (Rompun, Bayer) 1,5 mg/ekor dan ketamin HCl (Ketalar, Park-Davis) 0,3 mg/ekor *i.p.* untuk pembiusan umum. Pemindahan embrio dilakukan melalui bedah punggung seperti yang diuraikan oleh Hogan *et al.* (1986). Sebanyak 3-4 embrio per kornua atau 6-8 embrio per ekor dipindahkan ke dalam rahim induk penerima pada daerah kornua uteri. Hanya embrio bermutu bagus (*grade A*) yang dipindahkan ke induk penerima.

### Evaluasi

Pengamatan perkembangan embrio utuh (dengan zona pelusida) dan tanpa zona pelusida dilakukan setelah pembiakan *in vitro* selama lima jam yaitu dengan melihat jumlah embrio yang berkembang ke tahap berikutnya (morula ke tahap blastosis atau blastosis ke tahap blastosis ekspan). Pengamatan keberhasilan implantasi dan kebuntingan dari pemindahan embrio dilakukan pada H-10 kebuntingan melalui pembedahan rongga perut. Keberhasilan implantasi dihitung dari jumlah titik tempat terjadinya implantasi dan keberhasilan kebuntingan dihitung dari jumlah induk penerima yang bunting setelah dilakukan pemindahan embrio.

### Analisis Data

Melalui rancangan acak lengkap, data yang diperoleh dianalisis dengan Analisis Sidik Ragam pada taraf nyata 5% dan uji lanjut Beda Nyata Terkecil Fisher untuk persentase perkembangan *in vitro* dan implantasi. Uji beda proporsi digunakan untuk analisis persentase kebuntingan pada taraf nyata 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari Tabel 1 terlihat bahwa blastosis tanpa zona pelusida mampu berkembang ke tahap blastosis ekspan sama baiknya dengan blastosis utuh dengan keberhasilan berturut-turut 73% dan 76%. Akan tetapi jumlah morula tanpa zona pelusida yang mampu mencapai tahap blastosis lebih rendah ( $P < 0,05$ ) dibanding dengan morula utuh, yaitu masing-masing 19% dan 79%.

Hasil pembiakan selama lima jam menunjukkan bahwa embrio tanpa zona pelusida dapat hidup dan berkembang untuk mencapai tahap berikutnya dengan keberhasilan yang beragam. Blastosis tanpa zona pelusida berkembang lebih baik dibandingkan dengan morula tanpa zona pelusida. Pada embrio tahap morula terjadi proses perlekatan antar sel-sel blastomer atau yang dikenal sebagai proses pengompakan (Hafez *et al.*, 1993). Pronase merupakan enzim yang bersifat proteolitik sehingga selain melisis zona pelusida juga dapat mempengaruhi ikatan antar sel dan sitoskeletal sel-sel blastomer yang selanjutnya akan mengganggu proses pengompakan (Pratt, 1987). Bowman dan McLaren (1970) yang melakukan pembiakan morula mencit dengan waktu yang lebih lama (50-54 jam) melaporkan tidak terdapat perbedaan antara morula utuh dan tanpa zona pelusida yang

Tabel 1. Perkembangan morula utuh dan tanpa zona pelusida serta blastosis utuh dan tanpa zona pelusida pada pembiakan *in vitro* selama lima jam

Zona pelusida	Jumlah embrio yang dibiakkan		Jumlah embrio setelah pembiakan lima jam			
	Morula	Blastosis	Morula	Blastosis	Blastosis ekspan	Yang berkembang ke tahap berikutnya (%)
Utuh	62	-	13	14	35	49 (79) <sup>a</sup>
	-	41	-	10	31	31 (76) <sup>a</sup>
Tanpa zona pelusida	52	-	42	10	0	10 (19) <sup>b</sup>
	-	59	-	16	43	43 (73) <sup>a</sup>

Keterangan: a, b berbeda nyata pada kolom yang sama (P<0,05)

berkembang mencapai blastosis dengan keberhasilan sebesar 80%. Hal ini menunjukkan bahwa dibutuhkan waktu yang lebih lama bagi morula tanpa zona pelusida untuk pulih dan tumbuh menjadi blastosis dibanding morula utuh. Sebaliknya pada blastosis, proses pengompakan sel-sel blastomer telah selesai dan jumlah sel blastomer yang lebih banyak menyebabkan kemampuan tumbuh blastosis lebih tinggi dibanding morula, sehingga dapat mengurangi pengaruh proteolitik dari enzim ini. Hasil ini menunjukkan bahwa penghilangan zona pelusida dengan menggunakan pronase tidak mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan *in vitro* blastosis menciit, tetapi mempengaruhi perkembangan morula untuk mencapai tahap berikutnya dalam kurun waktu yang sama. Dengan kata lain blastosis lebih cepat pulih dan tumbuh setelah perlakuan penghilangan zona pelusida dibanding morula.

Dari Tabel 2 terlihat bahwa sebagian embrio hasil pembiakan *in vitro* ini setelah dipindahkan ke induk penerima mampu berkembang secara *in vivo*. Hasil pemindahan blastosis tanpa zona pelusida menunjukkan 13% embrio mengalami implantasi dan 67% induk penerima berhasil bunting, sedangkan hasil pemindahan blastosis utuh menunjukkan 48% embrio mengalami implantasi dan 100% induk penerima bunting. Meskipun keberhasilan implantasi embrio tanpa zona pelusida lebih rendah (P<0,05) dari pada embrio utuh, akan tetapi keberhasilan kebuntingan kedua kelompok ini tidak berbeda nyata (P>0,05).

Keberhasilan implantasi embrio tanpa zona pelusida ini sedikit lebih rendah dibanding dengan yang dilakukan oleh Bowman dan McLaren (1970) karena jumlah embrio tanpa zona pelusida yang dipindahkan per kornua uteri pada penelitian ini lebih sedikit. Selain itu metode pemindahan dengan memasukkan 3-4 embrio sekaligus ke dalam satu pipet dapat menyebabkan agregasi antar embrio tanpa zona pelusida pada saat pemindahan. Kemungkinan agregasi ini ka-

rena embrio tanpa zona pelusida mempunyai kecenderungan untuk saling melekat satu dengan yang lainnya (Pratt, 1987).

Penelitian pada hewan ternak dalam upaya pembuatan kembar identik melalui penyayatan embrio tahap sebelum implantasi menunjukkan bahwa embrio hasil penyayatan tersebut tidak perlu dimasukkan kembali ke dalam zona pelusida kosong karena tidak terdapat perbedaan persentase kebuntingan pada pemindahan embrio utuh dan tanpa zona pelusida (Tao *et al.*, 1991; de Armas *et al.*, 1992). Bahkan Boediono *et al.* (1993) berhasil memperoleh kebuntingan yang tinggi pada pemindahan embrio tanpa zona pelusida hasil agregasi pada sapi. Fong *et al.* (1997) telah melakukan penghilangan zona pelusida pada embrio manusia dengan menggunakan pronase 0,5% dan berhasil memperoleh kehamilan setelah dipindahkan kembali ke rahim ibu. Pada pasien yang mengalami gangguan kesuburan, perlakuan penghilangan zona pelusida ternyata dapat mengatasi kegagalan embrio keluar dari zona pelusida dan selanjutnya memungkinkan embrio untuk menempel ke dinding rahim dan melakukan proses implantasi (Fong *et al.*, 1998).

Kemampuan embrio tanpa zona pelusida untuk implantasi dan menghasilkan kebuntingan ini menunjukkan bahwa embrio tanpa zona pelusida dapat pulih dan berkembang secara *in vivo* setelah dipindahkan ke rahim induk penerima.

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa embrio tanpa zona pelusida mampu tumbuh dan berkembang dalam media biakan *in vitro* dan selanjutnya mengalami perkembangan *in vivo* dengan proses implantasi setelah dipindahkan ke dalam rahim induk penerima.

Tabel 2. Keberhasilan implantasi dan kebuntingan hasil pemindahan embrio (blastosis) utuh dan tanpa zona pelusida

Embrio yang dipindahkan		Jumlah induk penerima	Jumlah (%) embrio yang mengalami implantasi H-10*	Jumlah (%) induk penerima yang bunting H-10*
Zona Pelusida	Jumlah			
Utuh	25	3	12 (48) <sup>a</sup>	3 (100) <sup>c</sup>
Tanpa zona	45	6	6 (13) <sup>b</sup>	4 (67) <sup>c</sup>

Keterangan: \*Hari ketika terlihat sumbat vagina ditetapkan sebagai H-1 kebuntingan  
Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama berarti berbeda nyata pada P<0,05

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada Lembaga Penelitian, Institut Pertanian Bogor (LP-IPB) yang telah membiayai penelitian ini melalui Dana Anggaran Rutin tahun anggaran 1997/1998.

## DAFTAR PUSTAKA

- Armas R., R. Solano, A. Bernal and F. Gonzales. 1992. Factors Affecting *in vitro* and *in vivo* Viability of Bisected Cattle Embryos. *Theriogenology*, 37: 199. (Abstr.)
- Bediono, A., M. Ooe, M. Yamamoto, M. Takagi, S. Saha and T. Suzuki. 1993. Production of Chimeric Calves by Aggregation of *in vitro*-Fertilized Bovine Embryos without Zona Pellucida. *Theriogenology*, 40: 1221-1230.
- Bowman, P. and A. McLaren. 1970. Viability and Growth of Mouse Embryos after *in vitro* Culture and Fusion. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 23: 693-704.
- Burrows, R. G., and S. A. Brody. 1995. Principles and Practice of Assisted Human Reproduction. WB Saunders Company. Philadelphia. 692 pp.
- Chapel, S. and M. Symonds. 1993. Gamete and Embryo Manipulation in Human Reproduction. Edward Arnold, A Division of Hodder & Stoughton. London. 226 pp.
- Cheng, C. Y., A. Bongso, S. C. Ng, C. Anandakumar, A. Trounson, and S. Ratnam. 1997. Ongoing Normal Pregnancy after Transfer Of Zona-Free Blastocysts: Implications for Embryo Transfer in The Human. *Hum. Reprod.*, 12: 557-560.
- Cheng, C. Y., A. Bongso, S. C. Ng, J. Kumar, A. Trounson, and S. Ratnam. 1998. Blastocyst Transfer after Enzymatic Treatment of the Zona Pellucida: Improving *in-vitro* Fertilization and Understanding Implantation. *Hum. Reprod.*, 13: 2926-2932.
- Gray, K. R., K. R. Bondioli and C. L. Betts. 1991. The Commercial Application of Embryo Splitting in Beef Cattle. *Theriogenology*, 35: 37-44.
- Hafez, E. S. E. 1993. Reproduction in Farm Animals. Lea & Febiger. Philadelphia. 573 pp.
- Herr, C. M. and K. C. Reed. 1991. Micromanipulation of Bovine Embryos for Sex Determination. *Theriogenology*, 35: 45-54.
- Hogan, B., F. Constantini, and E. Lacy. 1986. Manipulating The Mouse Embryo, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 332 pp.
- Keefer, C. L. 1990. New Techniques for Assisted Fertilization. *Theriogenology*, 33: 101-112.
- Kippax, I., W. Christie and T. G. Rowan. 1991. Effects of Method of Splitting, Stage Development and Presence or Absence of Zona Pellucida on Foetal Survival in Commercial Bovine Embryo Transfer of Bisected Embryos. *Theriogenology*, 35: 25-35.
- Pratt, H.P.M. 1987. Isolation, Culture and Manipulation of Pre-Implantation Mouse Embryos. In Monk, M. (Ed): Mammalian Development, A Practical Approach. IRL Press. Oxford. pp. 13-42.
- Tan, L., L. Li, H., Liao, Y. Zhang, R. Liu and Z. Yan. 1991. The Survival of Quartered Bovine Embryos with and without Zonae Pellucidae. *Theriogenology*, 35: 279. (Abstr.)
- Tao, T., J. Shie, H. Yanqing, G. Changheng, M. Wenzhu, A. Tiezhu and Z. Yuding. 1991. The Survival of Zona-Free Bovine Demi- and Quarter Embryos. *Theriogenology*, 35: 281. (Abstr.)
- Vivanco, H. W., R. Rangel, P. Lynch and A. Rhodes. 1991. Large Scale Commercial Application of Bisection of Sheep Embryos. *Theriogenology*, 35: 292. (Abstr.)
- Wassarman, P. M. 1990. Profile of A Mammalian Sperm Receptor. *Development*, 108: 1-17.

## Chimeric Blastocysts by Aggregation between Parthenogenetic and Fertilized Bovine Embryos

Masao MURAKAMI and Tatsuyuki SUZUKI

United Graduate School of Veterinary Sciences,  
Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

Arief BOEDIONO

Faculty of Veterinary Medicine,  
Bogor Agriculture University,  
Bogor 16151, Indonesia

---

**Abstract:** Chimeric blastocysts were produced by aggregation of parthenogenetic and fertilized bovine embryos. To induce parthenogenetic activation, mature oocytes were treated with 7% ethanol and 5 mg/ml cytochalasin D and then cultured at 38.5°C under 5% CO<sub>2</sub> in air. Normal fertilized embryos were obtained by *in vitro* maturation, fertilization and culture. Aggregated embryos were prepared by four methods as follows: [1] injection of 2 blastomeres of a parthenogenetic embryo (16-cell stage) into a fertilized embryo (4-cell stage), [2] injection of a parthenogenetic demi-embryo (8-cell stage) into a fertilized demi-embryo (8-cell stage), [3] injection of a fertilized demi-embryo (8-cell stage) into a parthenogenetic demi-embryo (8-cell stage) and [4] aggregation of whole parthenogenetic and fertilized embryos (8-cell stage). The developmental rate *in vitro* of aggregated embryos produced by aggregation of the whole blastomeres (method [4]) tended to be higher than those by other methods (method [1] to [3]). Karyotyping thirteen aggregated embryos revealed 8 of them to be chimeric chromosome composition of XX and XY. These results verified that the parthenogenetic cells can be contributed to the development of the aggregated embryo.

**Key words:** parthenogenetic embryo, fertilized embryo, aggregated embryo, chimeric blastocyst

(Jpn J Fertil Steril 43:151-154 1998)

---

### Introduction

Parthenogenetic development of embryos to give live offspring occurs naturally in many non-mammalian species<sup>1)</sup>, and the phenomenon can also be induced experimentally in non-mammalian vertebrates and invertebrates<sup>2)</sup>. Although the parthenogenetically activated diploid mammalian embryos develop normally through preimplantation, they rarely reach to the forelimb-bud stage<sup>3)</sup> in mouse.

There are distinct differences between the paternal and maternal contribution to the embryonic development. The paternal genome appears to be more important for the proliferation of the extra embryonic

tissues and the maternal genome plays a key role in preimplantation and early postimplantation development<sup>4)</sup>.

Vital functional differences between the parental genomes of mammals have been demonstrated by embryonic lethality of parthenogenetic, gynogenetic and androgenetic uniparental genotypes<sup>5)</sup>. Cells derived from uniparental embryos were rescued by integration with normally fertilized embryos, which results in a chimeric organism<sup>6-8)</sup>. These phenomena may relieve the problem of mammalian parthenogenesis.

In the bovine oocytes, there are several effective ways to induce diploid parthenogenesis, such as exposure to ionophore A23187<sup>9)</sup> or ethanol, electric

stimulation, and combination of both ethanol exposure and electric stimulation<sup>10</sup>. It has been reported that, following transfer of bovine parthenogenetic embryos to recipients, estrous did not occur until day 48 after transfer of the single embryos<sup>11</sup>, whereas estrous was delayed upto day 67 after transfer of the aggregated embryos<sup>12</sup>. However, in these studies, their pregnancies could not be maintained over these periods, which was thought to be caused by the early embryonic death.

In the present study, we examined the *in vitro* developmental capacity of aggregates between parthenogenetic and fertilized bovine embryos produced by various methods. In addition, the contribution of the parthenogenetic cells to the aggregated embryos which developed to the blastocyst stage (chimerism of the embryos) was investigated by karyotyping them.

#### Materials and Methods

The method for producing diploid parthenogenetic embryos was applied according to the procedure described previously<sup>12</sup>. Briefly, oocytes were aspirated from the ovaries collected at slaughterhouse and matured for 32 h at 38.5°C under 5% CO<sub>2</sub> in air. These matured oocytes were suspended in culture medium containing 7% ethanol for 10 min to induce parthenogenetic activation, followed by treatment with 5 mg/ml cytochalasin D (5 h) to suppress the polar body extrusion, which resulted in production of diploid parthenogenotes. The oocytes were washed and then cultured *in vitro* on cumulus layers for further development.

The fertilized embryos were obtained by *in vitro* maturation, fertilization and culture<sup>13</sup>. The follicular

oocytes were matured for 22-24 h at 38.5°C under 5% CO<sub>2</sub> in air, fertilized with sperm capacitated *in vitro* and then cultured *in vitro*.

Aggregation chimeras were produced by following methods: [1] injection of 2 blastomeres derived from a parthenogenetic 16-cell embryo into a fertilized 4-cell embryo, [2] injection of a parthenogenetic demi-embryo (8-cell stage) into a fertilized demi-embryo (8-cell stage), [3] injection of a fertilized demi-embryo (8-cell stage) into a parthenogenetic demi-embryo (8-cell stage), and [4] aggregation of whole parthenogenetic and fertilized 8-cell embryos following removal of their zona pellucida<sup>14</sup>. The reconstructed embryos were then co-cultured on cumulus mono-layers and rechecked after 6 h to ensure that they had not drifted apart. Morphological examination was carried out at every 12 h; both the unaggregated embryos and aggregated embryos with extruded blastomeres were removed from the culture dish. The aggregated embryos were cultured until day 9 (day 0 - onset of IVF or activation) to examine their developmental ability to the blastocyst.

The developmental capacity among four methods were compared by Chi-square analysis and Fisher exact probability test. Differences at a probability value (P) of 0.05 or less were considered significant.

#### Results and Discussion

As shown in Table 1, the overall rates of development to the morula and blastocyst stages of the aggregated embryos were 56% and 45%, respectively. The developmental rate of the embryos aggregated their whole blastomeres (method [4]) tended to be higher than those of the embryos aggregated by injection meth-

Table 1. Developmental capacity of aggregates between parthenogenetic and fertilized bovine embryos

Aggregation method	No. of embryos examined	No. (%) of embryos developed to	
		Morula	Blastocyst
[1]	30	14 (47) <sup>a</sup>	9 (30) <sup>a</sup>
[2]	36	21 (58) <sup>a, b</sup>	16 (44) <sup>a, c</sup>
[3]	37	17 (47) <sup>a</sup>	14 (38) <sup>a, b</sup>
[4]	37	27 (73) <sup>b</sup>	24 (65) <sup>c</sup>
Total	140	79 (56)	63 (45)

Values with different superscripts within a column are significantly different [a-b, b-c (p<0.05); a-c (p<0.01)]

ods (methods [1] to [3]). The differences in the involved cell numbers among the aggregates might be responsible for this reason.

In order to prove the contribution of the parthenogenetic cells in blastocyst formation following aggregation, 13 blastocysts produced by methods [2], [3], and [4] were karyotyped<sup>15)</sup>. Eight out of the 13 embryos had both XX and XY chromosome plates within the same sample, and XX chromosome plates were detected in the remaining 5 embryos. These results demonstrate that the parthenogenetic cells (containing only XX chromosome plates) could also contribute to the development of the aggregated embryos to the blastocyst stage, although the distribution rate could not be analyzed by this method.

In the mouse study, the postimplantation development of the parthenogenetic conceptus was restricted by the infrequent development beyond implantation and complete lack of the development beyond placentation<sup>16)</sup>. The life and development of the parthenogenetically activated cells can be extended when chimeras were made between parthenogenetic and normally fertilized embryos<sup>8, 17, 18)</sup>. However, the contribution of the parthenogenetic cells to chimeras was low, and the total cell population was no more than 20%<sup>19)</sup>. The survival and integration of the parthenogenetic cells in such chimeras might be largely influenced by the environmental conditions determined by the cells from the fertilized embryos. Although the exact nature of this environmental influence remains unclear, there is an evidence for metabolic cooperation between genetically diverse cell types through permeable junctions that enable metabolically deficient cells to function normally<sup>20)</sup>. Similar cellular interactions between parthenogenetic and fertilized cells may also ensure cooperation of parthenogenetic cells in normal development.

The present results indicate that chimeric blastocysts can be produced by aggregation between parthenogenetic and fertilized bovine embryos. In an attempt to increase the participation of the parthenogenetic cells within the aggregated embryos, 2 blastomeres obtained from an advanced stage (16-cell) parthenogenetic embryo were injected into the fertilized 4-cell embryo. The concept of this trial is that the more advanced stage blastomeres (from the parthenoge-

netic embryos) would contribute to the inner cell mass (ICM), and the less advanced blastomeres (from the fertilized embryos) would develop to the trophectoderm<sup>21, 22)</sup>.

The next phase of this study is to examine the ability of these aggregated blastocysts to develop into a chimeric organism by transfer of the embryos to the recipients.

#### Acknowledgement

This research was financially supported by Grants-In-Aid for Scientific Research (No.08456160) from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan and Sasagawa Scientific Research Grant from the Japan Science Society.

#### References

- 1) White WK (1978) Modes of speciation. San Francisco. W.H.Freeman, pp119-123
- 2) Nagy A, Rajki K, Bakos J, et al. (1979) Genetic analysis in carp (*Cyprinus carpio*) using gynogenesis. *Heredity* 43:35-40
- 3) Kaufman MH, Barton SC and Surani MAH (1977) Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature* 265:53-55
- 4) Barton SC, Surani MHA and Norris ML (1984) Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 311:374-376
- 5) Solter D (1988) Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. *Annu Rev Genet* 22:127-146
- 6) Barton SC, Ferguson-Smith AC, Fundele R, et al. (1991) Influences of paternally imprinted genes on development. *Development* 113:679-688.
- 7) Mann JR and Stewart CL (1991) Development to term of mouse androgenetic aggregation chimeras. *Development* 113:1325-1333
- 8) Steven LC, Varnum DS and Eicher EM (1977) Viable chimaeras produced from normal and parthenogenetic mouse embryos. *Nature* 269:515-517
- 9) Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M, et al. (1989) Age dependence of bovine oocytes activation. *Gamet Res* 22:265-275
- 10) Yang X, Presicce GA, Moraghan L, et al. (1994) Synergistic effect of ethanol and cyclohexamide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology* 41:395-403
- 11) Fukui Y, Sawai K, Furudate M, et al. (1992) Parthenogenetic development of bovine oocytes treated

- with ethanol and cytochalasin B after *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev* 33:357-362
- 12) Boediono A, Saha S, Sumantri C, et al. (1995) Development *in vitro* and *in vivo* of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 7:1073-1079
  - 13) Boediono A, Takagi M, Saha S, et al. (1994) The influence of day 0 and day 7 superovulated cow serum during *in vitro* development of bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 6:261-264
  - 14) Boediono A, Ooe M, Yamamoto M, et al. (1993) Production of chimeric calves by aggregation of *in vitro* fertilized bovine embryos without zonae pellucidae. *Theriogenology* 40:1221-1230
  - 15) Tarkowski AK (1966) An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 5:394-400
  - 16) Kaufman MH (1983) Early mammalian development: Parthenogenetic studies. Cambridge Univ. Press, London, pp20-62
  - 17) Steven LC (1978) Totipotent cells of parthenogenetic origin in a chimaeric mouse. *Nature* 276:266-267
  - 18) Nagy A, Paldi A, Dezso L, et al. (1987) Prenatal fate of parthenogenetic cells in mouse aggregation chimera. *Development* 101:67-71
  - 19) Surani MHA, Barton SC and Kaufman MH (1977) Development to term of chimaeras between diploid parthenogenetic and fertilized embryos. *Nature* 270:601-603
  - 20) Pitts JD and Burk RR (1976) Specificity of junctional communication between animal cells. *Nature* 264:762-764
  - 21) Kelly SJ, Mulnard JG and Graham CF (1978) Cell division and cell allocation in early mouse development. *J Embryol Exp Morph* 48:37-51
  - 22) Godke RA and Rorie RW (1993) Embryo microsurgery for large animals. In: Fishel S and Symonds M (eds), Gamet and embryo micromanipulation in human reproduction. Edward Arnold, London, pp155-164

(Received December 24, 1997)

(Accepted February 14, 1998)

#### 牛単為発生卵と受精胚の集合によるキメリック胚盤胞の作出

山口大学大学院連合獣医学研究科

村上 正夫, 鈴木 達行

ボゴール農業大学獣医学科

A. Boediono

牛単為発生卵と受精胚の集合により、キメリック胚盤胞を作出した。単為発生卵は体外成熟卵母細胞を7%エタノール、サイトカラシンD(5 mg/ml)で活性化し、その後38.5℃、5% CO<sub>2</sub>条件下にて体外培養することにより得られた。受精卵に由来する胚は、卵母細胞を常法により体外にて成熟、受精、培養することで得られた。両者の集合胚は、以下の方法により作成した。

[1]単為発生卵(16細胞期)の割球2個を受精胚(4細胞期)に注入。[2]単為発生卵(8細胞期)の割球4個を同数の割球を含む受精胚(8細胞期)に注入。[3]受精胚(8細胞期)の割球4個を同数の割球を含む単為発生卵(8細胞期)に注入。[4]単為発生卵および受精卵由来の両胚(8細胞期)の全割球を集合。

これら集合胚の体外発生率は、全割球を集合(方法[4])した胚において、割球を注入(方法[1]、[2]、[3])したものに比べて、高い傾向がみられた。また、作出された集合胚盤胞の計13個について染色体検査を行ったところ、このうち8個においてXX、XYの両染色体が同一サンプル内に観察された。

以上の結果から、牛単為発生細胞は、上記の手法により作出した集合胚の胚盤胞形成に関与することが示唆された。

キーワード：単為発生卵、受精胚、集合胚、キメリック胚盤胞

(日不妊会誌 43:151-154 1998)