

PERKEMBANGAN EMBRIO SAPI SETELAH FERTILISASI MENGUNAKAN METODE INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI) DAN AKTIVASI DENGAN STRONTIUM

The Development of Bovine Embryo after Fertilization by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) Method and Strontium Activation

Muhammad Gunawan¹, Mokhamad Fahrudin², dan Arief Boediono²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor

²Bagian Embriologi, Departemen Anatomi, Histologi dan Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: muhammadgunawan@ymail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh kombinasi *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) dan aktivasi dengan strontium untuk mengetahui perkembangan pronukleus dan perkembangan embrio sampai tahap blastosis. Kombinasi ICSI dan strontium 20 mM meningkatkan perkembangan pronukleus 2-PN mencapai 43,59%. Hasil perkembangan embrio pada perlakuan kombinasi ICSI dan strontium 20 mM mencapai tingkat perkembangan 2-4 sel (50,5%), 8-16 sel (43,73%), dan blastosis (15,63%). Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah kombinasi ICSI dengan aktivasi strontium 20 mM mampu menghasilkan perkembangan *in vitro* embrio sapi yang lebih baik.

Kata kunci: perkembangan, embrio sapi, fertilisasi, ICSI, aktivasi

ABSTRACT

This experiment was conducted to find out the influence of the combination of *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) and strontium activation in order to find out pronucleous development. The combination of ICSI and 20 mM of strontium increased the development of pronucleous stage 2-PN into 43.59%. The development of embryo after ICSI and 20 mM strontium treatment increased up to 2-4 cells (50.5%), 8-16 cells (43.73%), and blastosyst (15.63%). The conclusion of the experiments is the combination of ICSI method followed by activation of strontium 20 mM obtaine better result of *in vitro* bovine embryo development.

Key words: development, bovine embryo, fertilization, ICSI, activation

PENDAHULUAN

Bioteknologi embrio telah berkembang dalam produksi embrio *in vitro* sebagai salah satu teknologi reproduksi berbantuan (*assisted reproductive technology*, ART). Penggunaan teknologi reproduksi berbantuan pada hewan ternak, satwa langka, dan manusia telah berlangsung dalam waktu yang lama, seperti penggunaan teknik inseminasi buatan (IB), fertilisasi *in vitro*, dan teknologi *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI). Aplikasi teknologi reproduksi berbantuan dapat digunakan untuk upaya peningkatan kualitas genetika ternak dan membantu mengatasi masalah yang berkaitan dengan keinginan untuk mempunyai keturunan.

Teknologi reproduksi berbantuan yang telah banyak diterapkan pada hewan percobaan dan manusia adalah fertilisasi mikro dengan cara ICSI. Pada metode tersebut, spermatozoa secara mekanik dimasukkan secara langsung ke dalam sitoplasma sel telur dengan bantuan mikromanipulator (Boediono, 2001). Walaupun teknik ICSI dianggap sederhana, tetapi dalam aplikasinya melibatkan berbagai macam persoalan termasuk masalah peralatan dan kemampuan teknik operator sehingga akan memengaruhi tingkat keberhasilan ICSI. Keberhasilan fertilisasi dengan metode ICSI untuk memproduksi embrio sampai

kelahiran anak telah dilaporkan pada kelinci (Iritani dan Hoshi, 1989), sapi (Goto *et al.*, 1990), dan manusia (Palermo *et al.*, 1992).

Perkembangan embrio terjadi mulai dari proses fertilisasi antara oosit dengan spermatozoa. Oosit yang diperoleh dari hasil ovulasi secara alami atau melalui maturasi secara *in vitro* adalah dalam kondisi matang (siap untuk dibuahi) yaitu pada kondisi metafase II (M-II). Perkembangan selanjutnya terjadi karena adanya aktivasi oleh spermatozoa atau proses aktivasi secara buatan. Aktivasi oosit oleh spermatozoa terjadi pada proses fertilisasi pada saat spermatozoa melakukan inisiasi terhadap fluktuasi Ca^{2+} di dalam oosit sampai terbentuk pronukleus. Fluktuasi Ca^{2+} selama fertilisasi terjadi beberapa jam sampai terbentuknya pronukleus kemudian berhenti dan terjadi lagi pada awal pembelahan mitosis embrio (Jones, 2007), sedangkan faktor dari oosit adalah keberadaan *inositol trifosfat* (IP_3) dan reseptornya yang mengatur fluktuasi $[\text{Ca}^{2+}]$ yang akan menurunkan aktivitas *maturation promoting factor* (MPF) (heterodimer *cyclin dependent kinase* 1/CDK1 dan *cyclin* B) dengan mendegradasi *cyclin* B (Madgwick *et al.*, 2005). Menurunnya MPF menyebabkan oosit melanjutkan proses meiosis kedua yang ditandai dengan keluarnya badan kutub II dan kemudian membentuk pronukleus betina. Aktivasi oosit secara alamiah dilakukan oleh spermatozoa, tetapi

dapat pula dilakukan secara buatan dengan listrik atau kimiawi untuk menstimulasikan sinyal ion Ca^{2+} dan penghambatan aktivitas MPF. Aktivasi buatan menggunakan bahan kimia dapat dilakukan dengan memaparkan oosit pada Ca ionofor, etanol, strontium klorida, *phorbol* ester, dan *thimerosal* (Alberio *et al.*, 2001). Penggunaan strontium sebagai agen partenogenesis telah dilaporkan pada mencit (Otaegui *et al.*, 1999), tikus (Tomashov-Matar *et al.*, 2005), dan sapi (Meo *et al.*, 2005). Strontium klorida (SrCl_2) dapat mengaktivasi osilasi kalsium [Ca^{2+}] internal oosit tikus melalui reseptor inositol trifosfat (IP_3) (Tomashov-Matar *et al.*, 2005). Meo *et al.* (2005) menggunakan strontium sebagai aktivasi tunggal pada oosit sapi untuk tujuan partenogenesis dan memperoleh embrio sampai tahap blastosis. Melihat potensi pemanfaatan teknologi reproduksi berbantuan yaitu metode ICSI dalam mengatasi hambatan dalam fertilisasi dan metode aktivasi dalam perbaikan tingkat perkembangan embrio, maka penelitian ini ditujukan untuk mengetahui perkembangan embrio sapi setelah fertilisasi menggunakan metode ICSI dan aktivasi dengan konsentrasi strontium yang berbeda.

MATERI DAN METODE

Penyiapan Oosit dan Sperma Sapi untuk ICSI

Ovarium sapi betina afkir diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Terpadu Kota Bogor dan dibawa ke laboratorium dalam media *ringer* laktat. Koleksi oosit dilakukan dengan metode penyayatan (*slicing*) dalam medium *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS, Gibco) ditambah 5% *fetal bovine serum* (FBS) dan 10 $\mu\text{l/ml}$ gentamisin. Oosit diseleksi berdasarkan keadaan sitoplasma yang homogen dan sel-sel kumulus yang kompak menggunakan mikroskop stereo (Nikon, SMZ-2T, Japan), kemudian dilakukan maturasi *in vitro* pada drop 50 μl media maturasi yaitu *tissue culture medium* (TCM-199), ditambah FBS 10%, *follicle stimulating hormone* (FSH, OvagenTM) 10 $\mu\text{g/ml}$, *human chorionic gonadotropin* (hCG, Chorulon) 10 $\mu\text{g/ml}$, estradiol 1 $\mu\text{g/ml}$, gentamisin 10 $\mu\text{l/ml}$, natrium piruvat (GibcoBRL) 0,25 mM, ditutup mineral oil dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator (Forma, Steri-Cycle) 5% CO_2 , suhu 38,8° C (Meo *et al.*, 2007).

Oosit hasil maturasi dilepaskan dari sel-sel kumulus dengan 0,2% hialuronidase dalam medium DPBS ditambah 10% FBS dan 10 $\mu\text{l/ml}$ gentamisin selama 10 menit. Hanya oosit dengan badan kutub I (tahap M-II) digunakan untuk ICSI. Spermatozoa sapi yang digunakan berasal dari semen beku yang dicairkan kembali (*thawing*) dalam *waterbath* dengan suhu 37° C selama 30 detik. Seleksi spermatozoa dengan cara *swim up*, dengan cara pelet spermatozoa hasil sentrifus kemudian ditambahkan 1 ml medium DPBS ditambah 10% FBS dan 10 $\mu\text{l/ml}$ gentamisin. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 10 menit agar spermatozoa mengurai dari kelompoknya dan bergerak ke arah permukaan larutan. Spermatozoa diambil pada bagian permukaan yang selanjutnya digunakan untuk ICSI.

Pelaksanaan ICSI dan Aktivasi

Metode ICSI yang digunakan pada penelitian ini mengikuti prosedur Boediono (2001) dengan modifikasi. Proses ICSI menggunakan mikroskop *inverted* (Nikon Diapot, Japan) dan mikromanipulator (Narisige, Japan), dimulai dengan melakukan aspirasi spermatozoa menggunakan mikropipet injeksi berdiameter bagian luar 10 μm dan diameter dalam 5-7 μm . Oosit difiksasi menggunakan mikropipet *holding* berdiameter bagian luar 100-150 μm dan berdiameter bagian dalam 20-40 μm . Pada proses ICSI oosit diarahkan sedemikian rupa sehingga badan kutub I berada pada posisi arah jam 12 atau jam 6. Spermatozoa diinjeksikan pada arah jam 3 yang merupakan sudut 90° terhadap badan kutub I untuk menghindari rusaknya inti sel yang berada di dekat badan kutub I. Setelah ICSI, oosit kemudian diaktivasi menggunakan strontium dengan perlakuan konsentrasi 0, 10, 20, dan 30 mM dalam modifikasi medium BO (Brackett dan Oliphant, 1975) tanpa Ca^{2+} dan Mg^{2+} , ditambah *bovine serum albumin* (BSA) 10 mg/ml, dan dikultur selama 6 jam dalam inkubator CO_2 .

Kultur dan Perkembangan Pronukleus

Oosit setelah ICSI dan aktivasi strontium kemudian dipindahkan dalam drop 50 μl medium kultur *synthetic oviduct fluid* (SOF) yang mengandung 5 mg/ml BSA, 2,5% FBS dan ditutup mineral oil, selanjutnya dikultur dalam inkubator 5% CO_2 , suhu 38,8° C. Evaluasi kemampuan fertilisasi oosit dilakukan 18 jam setelah ICSI dan aktivasi, dengan melihat terbentuknya pronukleus (PN). Pengamatan PN dilakukan dengan oosit dikultur selama 10-15 menit dengan pewarnaan 10 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 dalam medium DPBS. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop fluoresen (Imager.Z2, Carl Zeiss) dengan panjang gelombang 330-385 nm.

Kultur dan Perkembangan Embrio

Zigot hasil ICSI dan aktivasi kemudian dipindahkan dalam drop 50 μl medium kultur SOF yang ditambahkan 5 mg/ml BSA, 2,5% FBS dan ditutup mineral oil, selanjutnya dikultur dalam inkubator 5% CO_2 , suhu 38,8° C (Meo *et al.*, 2007). Pengamatan perkembangan embrio sampai tahap blastosis dilakukan setiap 24 jam dan penggantian medium setiap 48 jam.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola searah dengan perlakuan kombinasi ICSI dan aktivasi strontium konsentrasi 0, 10, 20, dan 30 mM, yang diulang sebanyak tiga kali. Penelitian pertama, variabel respons yang diukur adalah jumlah keberhasilan oosit mencapai perkembangan pronukleus. Pada penelitian kedua, variabel respons yang diukur adalah jumlah keberhasilan embrio mencapai perkembangan tahap 2-4 sel, 8-16 sel, morula, dan blastosis.

Analisis Data

Data kuantitatif dianalisis dengan analisis varian dan dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan Pronukleus setelah ICSI dan Aktivasi dengan Strontium

Penelitian pertama bertujuan untuk mengetahui keberhasilan ICSI dan aktivasi dengan konsentrasi strontium yang berbeda dilihat dari perkembangan pronukleus seperti yang disajikan pada Tabel 1. Terdapat lima kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (ICSI tanpa spermatozoa dan tanpa aktivasi), kontrol positif (ICSI dengan spermatozoa dan tanpa aktivasi/S0), ICSI dan aktivasi dengan strontium konsentrasi 10 mM (S1), 20 mM (S2), dan 30 mM (S3).

Keberhasilan fertilisasi dievaluasi dengan melihat perkembangan pronukleus 18 jam setelah ICSI dan aktivasi dengan strontium. Perkembangan pronukleus dilakukan dengan pewarnaan Hoechst 33342 yang mampu berikatan dengan DNA inti sehingga terlihat berpendar menggunakan mikroskop fluoresen. Parameter yang dievaluasi dari perkembangan terbentuknya PN dengan kategori terbentuk 1-PN, terbentuk 2-PN, dan tidak teridentifikasi. Perkembangan pronukleus dengan terbentuknya 1-PN pada semua perlakuan tidak menunjukkan perbedaan. Perkembangan 1-PN yang teramati selama penelitian ini kemungkinan merupakan perkembangan salah satu dari PN jantan atau PN betina tanpa diikuti oleh pronukleus pasangannya. Pronukleus jantan yang berkembang, kemungkinan dari spermatozoa yang diinjeksikan mengalami proses pemecahan ikatan disulfida membran inti spermatozoa, kemudian dilanjutkan dengan inisiasi dekondensasi kromosom membentuk PN jantan. Kemungkinan lain 1-PN yang terbentuk merupakan PN betina, oosit teraktivasi oleh strontium membentuk PN betina, tanpa diikuti dengan perkembangan pronukleus jantan. Hal ini didukung pendapat Hayasaka *et al.* (2006), yang melaporkan bahwa pada aktivasi dengan bahan kimia menyebabkan maternal sentrosom memengaruhi mikrotubulus sitoplasma untuk membentuk PN betina.

Pembentukan pronukleus dengan terbentuknya 2-PN pada perlakuan ICSI dan aktivasi dengan strontium 20 mM mencapai 43,59%, lebih tinggi ($P < 0,05$) dari strontium 30 mM dan kontrol. Perkembangan pronukleus dengan terbentuknya 2-PN pada penelitian

ini menggambarkan terjadinya kombinasi proses aktivasi oleh spermatozoa dan aktivasi dengan strontium telah mampu menginisiasi fluktuasi Ca^{2+} pada oosit sehingga terbentuk pronukleus betina dan pronukleus jantan. Pembentukan PN betina pada oosit dimulai dengan terjadinya proses aktivasi oleh faktor spermatozoa yang disebut *sperm oocyte activating factor* (SAF) yang akan melepaskan oosit dari tahap M-II sehingga berlanjut ke tahap selanjutnya. Adapun prosesnya dimulai dengan inisiasi fluktuasi Ca^{2+} dari dalam retikulum endoplasma sehingga aktivitas MPF menurun. Pembentukan PN jantan kemungkinan disebabkan terdapatnya kandungan *glutathion* (GSH) pada sitoplasma yang relatif tinggi sehingga mendukung pula inisiasi awal pembentukan PN jantan. Proses setelah spermatozoa diinjeksikan ke dalam oosit dan dilanjutkan aktivasi dengan strontium menyebabkan terjadinya proses biokimia yang simultan dan saling berkesinambungan antara oosit dan spermatozoa sampai masing-masing terbentuk PN. Hal ini didukung oleh Maedomari *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa konsentrasi GSH dalam oosit menunjukkan tingkat kematangannya dan memengaruhi keberhasilan dalam perkembangan embrio selanjutnya.

Perkembangan oosit yang tidak teridentifikasi dengan tidak adanya perkembangan pronukleus pada perlakuan ICSI dan aktivasi dengan strontium 20 mM mencapai 33,3%, lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan perlakuan yang lain. Oosit yang tidak teridentifikasi dalam penelitian ini, adalah oosit yang diamati tidak terdapat spermatozoa yang terkondensasi membentuk PN jantan. Hal ini diduga terdapat konsentrasi GSH di dalam sitoplasma oosit yang rendah sehingga tidak mampu mendukung proses pecahnya membran inti spermatozoa dan inisiasi dekondensasi kromosom. Kondisi ini seperti yang dinyatakan oleh Lee *et al.* (2003) bahwa faktor utama yang mengakibatkan kegagalan pembentukan PN jantan setelah ICSI pada oosit babi adalah konsentrasi GSH. Konsentrasi GSH sitoplasma oosit hasil maturasi *in vitro* tergantung pada kondisi awal proses maturasi yang ditentukan oleh keberadaan sel-sel kumulus. Sel-sel kumulus di sekitar oosit secara struktur dan metabolisme terhubung dengan oosit melalui *gap junction*, mekanisme hubungan ini diketahui mengatur sintesis GSH dan akumulasinya di dalam sitoplasma (Maedomari *et al.*, 2007). Keberadaan PN betina tidak ditemukan sehingga kemungkinan oosit telah mengalami degenerasi sehingga tidak ada pengaruh aktivasi oleh spermatozoa dan strontium. Proses degenerasi pada perkembangan

Tabel 1. Perkembangan pronukleus hasil ICSI dan aktivasi dengan strontium

Perlakuan SrCl ₂	Jumlah oosit	Pronukleus berkembang		Tidak teridentifikasi (%)
		1-PN (%)	2-PN (%)	
Kontrol (-)	35	0 (0,00) ^a	0 (0,00) ^a	35 (100,00) ^c
0 mM (S0)	33	5 (15,15) ^b	10 (30,30) ^b	18 (54,55) ^b
10 mM (S1)	35	6 (17,14) ^b	12 (34,29) ^{bc}	17 (48,57) ^b
20 mM (S2)	39	9 (23,08) ^b	17 (43,59) ^c	13 (33,33) ^a
30 mM (S3)	37	7 (18,92) ^b	12 (32,43) ^b	18 (48,65) ^b

^{a, b, bc, c}Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Tabel 2. Perkembangan embrio sapi setelah ICSI dan aktivasi dengan strontium

Perlakuan SrCl ₂	Kultur embrio (n)	Jumlah (%) embrio berkembang pada stadium				Tidak Berkembang (%)
		2-4 sel (%)	8-16 sel (%)	Morula (%)	Blastosis (%)	
Kontrol (-)	35	0 (0,00) ^a	0 (0,00) ^a	0 (0,00) ^a	0 (0,00) ^a	35 (100,00) ^c
0 mM (S0)	31	11 (35,48) ^b	10 (32,26) ^b	5 (16,13) ^b	1 (3,33) ^{ab}	20 (64,52) ^b
10 mM (S1)	33	14 (42,42) ^{bc}	12 (36,36) ^{bc}	7 (21,21) ^b	3 (9,09) ^{abc}	19 (57,58) ^{ab}
20 mM (S2)	32	16 (50,00) ^c	14 (43,75) ^c	9 (28,13) ^b	5 (15,63) ^c	16 (50,00) ^a
30 mM (S3)	33	12 (36,36) ^b	11 (33,33) ^b	5 (15,15) ^b	2 (6,06) ^{ab}	21 (63,64) ^b

a, ab, b, bc, abc, ^cSuperskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata (P<0,05)

awal embrio kemungkinan disebabkan perubahan drastis pada sintesis protein embrio, terjadi sinyal internal yang mematikan kontrol maternal pada proses pembelahan dan kontrol pertumbuhan embrio, sehingga bila hal ini terjadi maka embrio tidak dapat diselamatkan dan akhirnya mengalami kematian (Haydar, 2001).

Perkembangan Embrio setelah ICSI dan Aktivasi dengan Strontium

Penelitian kedua bertujuan mengetahui hasil perkembangan embrio sapi setelah ICSI dan aktivasi dengan konsentrasi strontium yang berbeda yang disajikan pada Tabel 2.

Perkembangan embrio sapi hasil ICSI dan aktivasi dengan strontium setelah dikultur dalam medium SOF selama 48 jam mencapai tahap 2 sel, kultur 72 jam mencapai tahap 4 sel, kultur 96-120 jam mencapai tahap 8 sel, kultur 144-168 jam mencapai tahap morula dan kultur 192 jam mencapai tahap blastosis. Hasil yang diperoleh menunjukkan perkembangan embrio sapi tertinggi pada perlakuan S1 dan S2 dibandingkan perlakuan kontrol/S0 dan S3. Pada penelitian ini tingkat pembelahan embrio mencapai 50% dan blastosis 15,63%. Hasil ini masih lebih rendah dibandingkan dari hasil penelitian Suttner *et al.* (2000) yang melaporkan perkembangan embrio hasil ICSI dan aktivasi dengan kalsium ionofor yang dikultur dalam medium SOF mencapai pembelahan embrio 79,6% dan blastosis 28,2%. Perkembangan embrio *in vitro* tahap 2 sel mencapai blastosis dipengaruhi oleh lingkungan luar untuk mendukung perkembangannya. Tingkat keberhasilan perkembangan embrio yang dihasilkan dengan menggunakan media kultur sangat beragam, khususnya embrio yang diperoleh melalui proses fertilisasi *in vitro* atau dari satu sel, jumlah dan daya hidup embrio yang dihasilkan masih rendah dapat disebabkan salah satunya adalah kondisi kultur yang suboptimum (Djuwita *et al.*, 2000). Pengaruh lain disebabkan konsentrasi spermatozoa, osmolaritas dan pH medium, serta kondisi kultur yang meliputi suhu, keseimbangan gas O₂ dan CO₂ (Boediono *et al.*, 2000).

KESIMPULAN

Fertilisasi dengan metode ICSI dan dilanjutkan aktivasi dengan strontium konsentrasi 20 mM selama 6 jam, dapat meningkatkan keberhasilan fertilisasi dan perkembangan embrio dari tahap 2 sel sampai dengan blastosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberio, R., V. Zakhartchenko, J. Motlik, and E. Wolf E. 2001. Mammalian oocyte activation: Lessons from the sperm and implication for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.* 45:797-809.
- Boediono, A. 2001. Sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and oocyte activation improves early development of microfertilized goat oocyte. *Reprotech.* 1:29-34.
- Boediono, A., Y. Rusianto, K. Mohamad, I. Djuwita, dan Herliatien. 2000. Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi, dan kultur *in vitro*. *Media Vet.* 7(4):11-17.
- Brackett, B.G., and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *J. Biol. Reprod.* 12:260-274.
- Djuwita, I, L. Amalia, Widjiati, dan K. Mohamad. 2000. Efek konsentrasi glukosa dalam medium dengan dan tanpa fosfat terhadap perkembangan embrio preimplantasi mencit secara *in vitro*. *Media Vet.* 7(1):9-12.
- Goto, K., A. Kinoshita, Y. Takuma, and K. Ogawa. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet. Rec.* 127:517-520.
- Hayasaka, S., Y. Terada, J. Morita, M. Tachibana, Y. Shima-Morito, T. Kakoi-Yoshimoto, S. Nakamura, T. Murakami, N. Yaegashi, and K. Okamura. 2006. Mini review. Post-ICSI cytoskeletal dynamics during fertilization. *J. Mamm. Ova Res.* 23:21-26.
- Haydar, B., K. Levent, O. Hande, and S. Hakan. 2001. Effect of CZB medium on the two cell block of preimplantation mouse embryos. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 25:725-729.
- Iritani, A. and Y. Hoshi. 1989. Microfertilization by various methods in mammalian species. *Progress in Clinical and Biological Research.* 294:145-149.
- Jones, K.T. 2007. Intracellular calcium in the fertilization and development of mammalian eggs. *Proc. Aust. Phys. Soc.* 38:35-41.
- Lee, J., X.C. Tian, and X. Yang. 2003. Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 68:1341-1347.
- Madgwick, S., M. Levasseur, and K.T. Jones. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. *J. Cell Sci.* 118:3849-3859.
- Maedomari, N., K. Kikuchi, M. Ozawa, J. Noguchi, K. Ohmura, M. Nakai, M. Shino, T. Nagai, and N. Kashiwazaki. 2007. Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development *in vitro*. *Theriogenology.* 67:983-993.
- Meo, S.C., W. Yamazaki, C.L.V. Leal, J.A. de Oliveira, and J.M. Garcia. 2005. Use of strontium for bovine oocyte activation. *Theriogenology.* 63:2089-2102.
- Meo, S.C., W. Yamazaki, C.R. Ferreira, F. Perecin, N.Z. Saraiva, C.L.V. Leal, and J.M. Garcia. 2007. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. *Zygote.* 15:295-306.
- Otaegui, P.J., G.T. O'Neill, and I. Wilmut. 1999. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by exposure to strontium as a source of cytoplasts for nuclear transfer. *Cloning.* 1:111-117.
- Palermo, G., H. Joris, P. Devroey, and A.C.V. Steirteghem. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet.* 340:17-18.
- Suttner, R., V. Zakhartchenko, P. Stojkovic, S. Muller, R. Alberio, I. Medjugorac, G. Brem, E. Wolf, and M. Stojkovic. 2000. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology.* 54:935-948.
- Tomashov-Matar, R., D. Tchetchik, A. Eldar, R. Kaplan-Kreicer, Y. Oron, and R. Shalgi. 2005. Strontium-induced rat egg activation. *Reproduction.* 130:467-474.