

STUDI SITOGENETIK TERNAK LOKAL UNTUK STANDARISASI KROMOSOM DAN DETEKSI ABNORMALITAS GENETIK TERNAK RUMINANSIA LOKAL

Ciptadi,G., Nur Ihsan,M., dan V.M. Ani Nurgiartiningsih
**
Bagian Produksi Ternak Fakultas Peternakan UB

Abstrak

Analisis kromosom ternak lokal di Indonesia sangat penting artinya karena masih sangat terbatasnya data-data genetik dasar yang ada selama ini. Bagi ternak bibit analisis kromosom perlu dilakukan untuk mendeteksi kemungkinan munculnya cacat genetik yang heriditer. Hal ini perlu dicermati mengingat bahwa peluang pewarisan kepada generasi berikutnya adalah sangat besar terkait jumlah anak keturunan yang bisa dihasilkan dari seekor pejantan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis kromosom ternak ruminansia lokal di Indonesia yaitu sapi, kerbau dan kambing. Pada ternak lokal Indonesia masih sangat terbatas dilakukan analisis kromosom, padahal sangat penting terutama bagi ternak bibit. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan bagi strategi peningkatan kualitas genetik ternak ruminansia lokal.

Metode digunakan standart kariotyping menggunakan sampel darah (*whole blood*) dengan *G banding*. Kariotyping dilakukan dengan dasar standart yang sudah ada. Preparasi kromosom menggunakan medium Karyo MAX (GIBCO/BRL), Colcemid Solution, Giemsa Stain dan Potasium chloride solution. Kultur sel dilakukan berdasarkan metode standar kariotyping mamalia. Minimal jumlah 5 buah *spreading Metafase II* kromosom terbaik, dilakukan microfotografi dan kemudian dilakukan analisis kromosom dengan software *cytovision image analysis*, ditentukan normal tidaknya kromosom berdasarkan standart kariotyping.

Hasil Penelitian ini tidak ditemukan ternak ruminansia dengan abnormalitas jumlah kromosom, sehingga bisa diartikan bahwa tidak ada beberapa abnormalitas kromosom karena genetik seperti translokasi robertson ($2N=58$) atau kelainan jumlah kromosom yang lain. Pada semua ternak yang diamati kromosomnya ditemukan kromosom $2N$ (sapi Madura $2N = 60$), kerbau (swamp buffalo, $2N=50$) dan Kambing (kambing PE dan kacang $2N= 60$) yang terdiri atas 58, 48 dan 58 autosom dan 2 seks kromosom. Analisis perlu ditingkatkan ketelitiannya menggunakan teknik FISH, *immunofluorescent*, *cytovision image analysis* dilengkapi *software* yang sesuai. Ruminansia lokal Indonesia perlu dilakukan penyusunan standart kariotyping, khususnya pada ruminansia yang diproduksi sperma bekunya untuk keperluan implementasi Inseminasi Buatan, sangat direkomendasikan untuk dilakukan kariotyping sebagai jaminan normalitas genetik serta bebas cacat genetik heriditer.

Kata Kunci: Kariotyping, Kromosom, Ruminansia, Abnormalitas Genetik.

CYTOGENETIC ANALYSIS FOR KARYOTYPE STANDARITATION AND DETECTION OF GENETIC ABNORMALITY OF LOCAL RUMINANT

ABSTRACT

On the basis of the important of chromosome abnormalites and their negative effect in the near future, chromosomal investigation of breeding domestic animals and their progeny began in different countries. Chromosomal abnormality are usually considered to be a plague and are to eliminate. In Indonesia, where Artificial Insemination (AI) implementation have started intensively, chromosomal aberration can be identified and culled from breeding program. This work has so far has been neglected in Indonesia.

Method performed by collecting blood samples from ruminant (Madura, Buffalo and Goat) Sample of 0.5 ml of blood sample per animal was added to 5 ml chromosomal medium (Karyo MAX ^Gibco), placed in incubator at 38 oC. After 70 hours, culture tube were removed from incubator, add to 1 ml working solution of colchicines and kept for 2 – 3 hours. The tubes were centrifuge at 1000 RPM for 10 minute using PBS and supernatant was discarded, doing for 2 times respectively. The pellet toghly packed cells added then by fixative solution. Slides were prepared by dropping the cell suspension on the glass slide and dried then stained with Giemsa stain for 10 minute. Slides were examined under high power phase-contrast microscope to study the chromosome spread in the single cells.

Result showed that the 2N diploid number of chromosome or 3 ruminat were normal (cattle 2N=60, Swamp buffalo 2N=50 Goat 2N=60), there were 58 autosome and 2 sex chromosome in all animals observed. It was observed that all ruminant tested in these research were normal categories. The karyotype analysis showed that the chromosomes of one cell and different individual each breed varied in size, shape and position of centromere. How ever, it was strongly recommended to performed chromosomal investigation of breeding ruminants especially for Artificial Insemination bull purposes and others Indonesia local specific species using advanced sophisticated tools of analysis like cytovision image analysis of fluorescent technique.

Key Words: Karyotiping, Ruminant Chromosome, Abnormalities.

PENDAHULUAN

Kejadian abnormalitas genetik (kromosom) bisa terjadi setiap saat karena kesalahan mitosis, meiosis atau pada saat terjadinya fertilisasi. Kariotiping atau analisis kromosom hewan dan ternak adalah merupakan suatu tahapan atau pintu gerbang yang harus dilewati dalam pemahaman dasar tentang pola pewarisan sifat dari orang tua kepada keturunannya. Suatu analisis kromosom, khususnya ternak lokal di

Indonesia, dirasakan sangat penting artinya karena masih sangat terbatasnya data-data genetik dasar yang ada selama ini (Ciptadi, 2003). Bagi ternak bibit analisis kromosom perlu dilakukan untuk mendeteksi kemungkinan munculnya cacat genetik.

Sumber Daya Genetik sapi potong yang ada di Indonesia selama ini belum banyak di deskripsikan secara jelas dan spesifik. Padahal dengan adanya kebijaksanaan masa lalu dengan

impor bibit unggul dan penerapan Inseminasi Buatan (IB), khususnya dengan straw pejantan-pejantan Bos taurus tentunya telah menghasilkan cukup banyak sapi hasil persilangan dengan sapi lokal. Data populasi sapi potong di Indonesia menunjukkan bahwa sekitar 49.4 % populasi terdiri dari bangsa sapi lokal seperti sapi Onggol, Peranakan Onggole, Madura dan Bali serta hasil keturunannya. Sedangkan sisanya sebesar 50.68 % dari sekitar 11. juta lebih sapi potong di Indonesia bisa dikategorikan sebagai bangsa sapi yang belum teridentifikasi dengan baik (Anonimus, 1996, Ciptadi, 1998) dan sampai sekarang diduga juga belum berubah dari sekitar 10.8 juta populasi yang ada (Anonimus, 2006). Sebagian besar dari sapi-sapi yang belum teridentifikasi bangsanya ini, merupakan keturunan dari sapi-sapi pejantan (straw import) hasil IB yang merupakan sapi-sapi Bos taurus dari daerah subtropis.

Pada beberapa spesies hewan dan ternak telah ditemukan adanya berbagai abnormalitas dalam jumlah kromosom dan kelainan struktur (Ciptadi, 2003). Secara umum abnormalitas kromosom terkait dengan beberapa sifat produksi dan reproduksi, khususnya untuk masalah-masalah fertilitas ternak. Di Meo *et al.* (2006, 2008), melaporkan bahwa abnormalitas kromosom terkait dengan fertilitas ternak, 20 % dari ternak kerbau sungai yang mempunyai masalah reproduksi menunjukkan adanya abnormalitas pada X monosomi, X trisomi, seks *reversal syndrome* dan *free- martin*, dimana semua betina adalah steril. Sementara itu Viuff *et al* (2001) melaporkan bahwa kejadian abnormalitas kromosom pada embrio

hasil produksi *in vitro* lebih tinggi dari *in vivo*.

Dari berbagai laporan data di lapang, disebutkan adanya variasi yang sangat besar terhadap tingkat produktifitas dan reproduktifitas ternak, juga ada ditemukan kasus-kasus kegagalan reproduksi yang tidak optimal. Data-data lapang yang ada perlu dilakukan suatu analisis yang mendalam untuk bisa dengan lebih akurat dapat memberikan suatu evaluasi terhadap sapi-sapi hasil persilangan.

Banyak peneliti genetika dan pemuliaan ternak telah membuktikan bahwa genom dari hewan dan ternak terorganisir dalam kromosom-kromosom yang spesifik dan bahwa kromosom-kromosom tersebut dapat ditata didalam kelompok-kelompok membentuk suatu kariotyping karena kromosom adalah spesifik untuk setiap spesies hewan dan ternak. Kariotyping sebagai suatu metode untuk menganalisa kromosom sekarang ini jangkauannya sangat luas dan menjadi salah satu topik penelitian yang mempunyai nilai sangat tinggi. Metode pemetaan dan analisis kromosom ini jelas-jelas dapat digunakan sebagai alat penunjang untuk suatu riset yang penting dan mendalam bagi para peneliti yang bergerak dalam bidang genetika hewan dan ternak pada tingkat sel dan molekuler. Masih sangat banyak sekali jumlah spesies hewan dan ternak yang belum mempunyai data dasar genetik dan peta kromosom.

Adanya abnormalitas kromosom seperti ini sangat perlu untuk diperhatikan, khususnya bagi pejantan bibit yang akan digunakan produksi spermatozoanya untuk inseminasi buatan maupun produksi

embrio *in vitro* dan *in vivo*. Hal ini perlu dicermati mengingat bahwa peluang pewarisannya kepada generasi berikutnya adalah sangat besar dan kontribusi jumlah anak keturunan yang bisa dihasilkan dari seekor pejantan adalah sangat besar mencapai puluhan ribu anak pertahunnya.

Penelitian ini adalah untuk melakukan analisis awal sitogenetik beberapa spesies ternak (Sapi, kerbau dan kambing) lokal Indonesia. Meskipun suatu kariotyping yang normal bukan merupakan suatu jaminan suatu produktifitas ternak yang tinggi dan jaminan terhadap tidak adanya penyakit tertentu atau sebaliknya suatu abnormal kariotyping menunjukkan suatu penyakit dan produktifitas yang rendah, namun hal ini tetap sangat perlu diperhatikan, khususnya yang terkait dengan pembibitan dan kelangsungan hidup generasi hewan dan ternak tersebut. Hal ini menjadi penting, karena efek utama abnormalitas kromosom adalah kontribusinya terhadap rendahnya performans reproduksi hewan dan ternak dengan terjadinya penurunan kemampuan dan kegagalan fungsi produksi gamet dan terjadinya kematian embrio dini yang sangat berpengaruh terhadap fertilitas dan performans reproduksi dan produksi sapi. (Ciptadi, 2003).

METODE PENELITIAN

Materi dan Lokasi Penelitian

Penelitian difokuskan untuk melakukan kariotyping pada anak rumi di lokasi Sapi, Kambing dan kerbau lokal I

Metode Analisis kariotyping kromosom sapi

Metode yang digunakan mengacu pada metode standart kariotyping menggunakan sampel darah

(*whole blood*/limphosit) dengan menggunakan pewarnaan G-Giemsa dan *G banding*. Kariotyping dilakukan dengan dasar standart pola yang sudah ada (Ford et al, 1980, Ciptadi, 2003, Fecheimer, 1985, Miyake, 1985). Kelompok sample dibagi dalam 3 kelompok besar, yaitu:

Preparasi kromosom

Preparasi kromosom dilakukan menggunakan medium Karyo MAX (GIBCO/BRL), Colcemid Solution, Giemsa Stain dan Potasium chloride solution. Kultur dan preparasi preparat kromosom dilakukan berdasarkan metode yang dimodifikasi dari Ciptadi, 2003, Mondal, 2007, Lunberg, 1990, Pires *et al*, 1998. dan Miyake, 1985, Ahmad *et al*, (2004), yang secara garis besar meliputi tahapan: (1) preparasi kultur sel darah (*whole blood*), (2). Inkubasi dalam inkubator CO₂ 37 ° C selama 70 jam, (3). Penghentian pembelahan sel pada metafase dengan penambahan colcemid, (4). perlakuan hipotonik dan fiksasi sel, serta (6). pembuatan slide kromosom serta *G-banding*.

Analisis Kromosom (Kariotyping)

Analisis kromosom dilakukan dengan metode standart dengan bantuan staining Giemsa (*banding*). Pada masing-masing preparat individu sapi dengan minimal jumlah 5 buah *spreading Metafase II* kromosom terbaik, dilakukan microfotografi dan analisis kromosom dengan software *sketch picture* dan atau perangkat dan *tool Complete band caryotyping system/cytovision image*, kemudian ditentukan normal tidaknya kromosom berdasarkan standart kariotyping yang

ada pada sapi secara umum. Jumlah sample masing-masing satuan perlakuan (pejantan-induk-anak) adalah 4 ekor. Sampel anak hasil persilangan akan ditambah sesuai dengan kebutuhan jika diperlukan.

Standarisasi Karyotyping

Suatu gambaran kromosom ternak hasil preparasi dari suatu rangkaian kerja kariotyping yang sederhana paling tidak akan dapat memberikan informasi ciri yang spesifik dari setiap spesies hewan dan ternak mengenai jumlah, morfologi dan abnormalitas kromosom. Dari hasil preparasi tersebut kemudian dapat dikembangkan berbagai analisis genetik dari makhluk hidup yang bersangkutan. Salah satu teknik *banding* yang bisa digunakan untuk karyotyping adalah Trypsin-Giemsa namun kadang kadang

tidak bisa diperoleh kualitas banding yang baik, karena banding sering-sering terlalu dekat satu dengan yang lain (Yamanaka, 1977).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis terhadap jumlah kromosom

Analisis pertama yang dilakukan pada kromosom dimaksudkan untuk mengetahui ada tidaknya abnormalitas pada jumlah kromosom pada masing-masing kelompok ternak ruminansia . Pada masing masing kelompok dilakukan sampling secara purposive sebanyak masing-masing minimal 4 ekor (jantan dan betina).. Hasil analisis kromosom disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1

Tabel 1. Hasil analisis jumlah kromosom masing-masing kelompok ternak.

No	Kelompok Sapi	Jumlah sapi (ekor)	Hasil analisis	
			Sapi Normal , 2N = 60 (%)	Sapi abnormal (%)
1.	Sapi Madura: jantan dan betina	4	4	0
2.	Kerbau Lokal, Jantan dan Betina	4	4	0
3.	Kambing: PE dan Kacang	5	5	0

Secara umum pada penelitian ini tidak ditemukan ternak ruminansia dengan abnormalitas jumlah kromosom, sehingga bisa diartikan bahwa pada semua kelompok sapi tidak ditemukan adanya beberapa abnormalitas kromosom karena genetik seperti translokasi robertson (2 N=59)

atau kelainan jumlah kromosom yang lain.

Namun demikian dengan adanya problem-problem dilapangan yang menyangkut performans reproduksi sapi hasil persilangan dan diduga hal ini terkait dengan seks kromosom, maka dipandang perlu lebih jauh untuk

menganalisis baik untuk morfologi kromosom tubuh dan seks kromosom. Hal ini perlu dilakukan, terutama misalnya pada sapi hasil persilangan hasil Inseminasi Buatan dimana pada standart kromosom antara bangsa pejantan (bos Taurus) dan induk Llokal (keturunan bibos Banteng dan bos

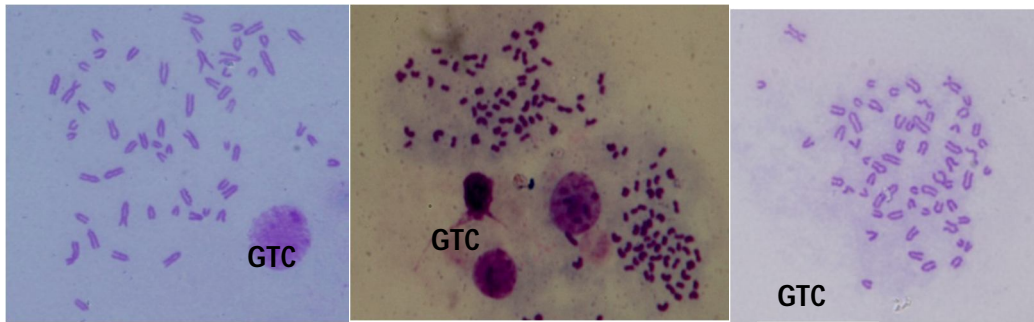
Indicus) mempunyai bentuk morfologi yang berbeda, sehingga diduga akan mempunyai efek terhadap penampilan reproduksi, karena ketidak sesuaian seks kromosom paternak dan maternal (Tabel 1).

Tabel 1. Standar kariotiping secara umum berdasarkan jumlah dan morfologi kromosom pada pada beberapa spesies mamalia (ternak ruminansia)(Ciptadi, 2003, Fecheimer, 1985, Eldridge, 1985).

No	Jenis Sapi (bangsa)	Jumlah kromosom (2N)	Morfologi Kromosom Tubuh		Morfologi Seks kromosom	
			Biarmed	Single armed	Krom. X	Krom. Y
1.	Sapi Madura	60	-	58	Submetasentris	Submetasentris
2	Sapi PO	60	-	58	Submetasentris	Acrosentris
3.	Kerbau Lumpur	48	10	36	Acrosentris	Acrosentris
4.	Kambing PE	60	-	58	Acrosentris	Metasentris

Secara umum hasil penelitian ini menunjukkan bahwa analisis kromosom pada semua bangsa sapi yang diamati menunjukkan adanya variasi ukuran, ketajaman gambar dan posisi sentromer kromosom antara sel yang satu dengan yang lain. Pada semua sapi yang diamati kromosomnya ditemukan kromosom 2 N diploid berjumlah 60 buah dan normal, yang

terdiri atas 58 autosom dan seks kromosom. Kerbau lumpur (2N=48) terdiri dari 46 autosom (10 biarmed dan 36 Single armed) Seks kromosom sapi betina dalah XX dan jantan adalah XY. Kromosom X Sapi adalah kromosom sub metasentris dengan ukuran paling besar, sebaliknya kromosom Y adalah berukuran paling kecil. Autosom atau kromosom tubuh adalah akrosentris.



Gambar 1. Kromosom metafase ternak ruminansia (sapi) menunjukkan jumlah normal kromosom $2N=60$, masing untuk jenis kelamin jantan (XY dan betina XX).

Hasil penelitian ini menunjukkan hasil yang tidak berbeda dengan penelitian sebelumnya, khususnya pada sapi-sapi *Bos indicus*, (Anis et al, Lioi et al, 1995), yang melakukan analisis kromosom sapi dari breed sahiwal, Red Shindi dan Brahman) yang menunjukkan bahwa semua breed sapi mempunyai jumlah kromosom normal $2N=60$, dan dilaporkan bahwa semua autosome adalah akrosentris.

Kejadian abnormalitas morfologi kromosom tidak ditemukan pada kelompok atau populasi sapi induk baik sapi Madura, PO, kerbau dan kambing. Dengan demikian kekawatiran kemungkinan adanya translokasi robertson $1/29$ pada pejantan *Bos Taurus* (Limousin) tidak ditemukan pada penelitian ini

Karyotyping Kromosom

Hasil karyotiping pada penelitian ini dilakukan secara manual pada kualitas spreading terbaik dari masing-masing perlakuan. (Gambar 1.). Hasil preparasi kromosom sapi ini pada umumnya menghasilkan kualitas kromosom metafase yang bervariasi dari aspek kualitas *spreading*

kromosom dan tingkat ketajaman gambar dan kualitas staining. *Spreading* kromosom yang kurang menyebar dengan baik akan menyulitkan baik untuk penghitungan jumlah kromosom, pengamatan morfologi kromosom serta kemungkinan adanya kromosom yang saling tumpang tindih, walaupun fase kromosom metafase cukup tinggi. Dari sisi morfologi juga terobservasi adanya ukuran kromosom yang bervariasi besar dan kecilnya antara satu sel satu dengan yang lain atau antara individu sapi dengan yang lain.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil analisis kromosom dari penelitian ini menunjukkan adanya variasi ukuran, ketajaman gambar dan posisi sentromer kromosom berbeda antara sel yang satu dengan yang lain. Hasil penelitian menunjukkan tidak ditemukannya abnormalitas kromosom, namun analisis perlu ditingkatkan ketelitiannya dengan menggunakan standart baku atau menggunakan teknik analisis yang lebih modern seperti teknik *cytovision image analysis* dan dilengkapi *soft ware* yang sesuai.

Perlu dilakukan analisis kromosom dengan menggunakan kamera yang lebih baik resolusi dan pixelnya dilengkapapi *soft ware* yang lebih standart seperti *cytovision* atau *cyto band-view*. Pada ternak ruminansia lokal yang ada di Indonesia perlu dilakukan penyusunan standart kariotyping dengan menggunakan software standart. Pada ternak-ternak ruminansia yang diproduksi sperma bekunya untuk keperluan produksi massal untuk implementasi Inseminasi Buatan (IB) sangat direkomendasikan untuk dilakukan kariotyping untuk menjamin normalitas kesehatan dan genetiknya misalnya tidak punya cacat genetik yang heriditer.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad,I, K. Javed and A. Sattar. 2004. Screening of breeding bull of different breeds through karyotyping. *Pakistas Veterinaire Journal* 24 (4), 2004: 190-192.
- Anis,M., S. Ali , Z . Ahmad and M.A. Khan. 1990. Studies on the karyotypes of Sahiwal cattle. *Pakistan Vet Journal* 10 (2): 88 – 91.
- Ciptadi,G. 1998. PrtotoKol percobaan kariotiping kromosom pada hewan dan ternak. Fakultas Peternakan Unibraw.
- De Luca,J.C., P. Sister, A. Prando, A. Baldo and G. Giovambattista. 2007. Absence of 1/29 translocation in aberdeen Angus Breed.J. *analecta veterinaria* 2007; 27 (2).
- Di Meo,G.P., A. Perrucatti, R. Di Palo, A. Ianuzzi, F. Ciotola, V Peretti, G. Neglia, G. Campanile, L. Zicarelli, L, Iannuzzi. 2008. Sex abnormalities and sterility in river buffalow.J. *Cytogeneti and Genome Research*.Vol 120, No.1-2, 2008.: 127 – 131.
- Di Meo,G.P., A Perrucatti, R. Chaves, F. Adegas, L. De Lorenzi, L. Molteni, A.D. Giovanni, D. Incarnato, H.G. Pinto A. Eggen and L. Iaanuzzi. 2006. *Cattel Rob* (1;29) originating from complex chromosome rearrangement as revealed by both banding and FISH-mapping technique. *J. Chromosome Reasearc* (2006) 14: 649 -655.
- Gallagher, D. S., Jr.B.C. Lewis, M. De Donato, S.K. Davis, J.F. Taylor and J.F. Edwards. 1999. Autosomal Trisomy 20 (61,XX,+20)in malformed Bovive Fetus. *Journal Vet. Pathol*, 36: 448 – 451.
- Gustavsson, Z. 1979. Distribution and effect of the 1/29 robertonian translocation in cattle. *J. Dairy Science* 62 (5); 825-835.
- Lioi, M.B., M.R. Scarfi., D.Di Berardino and Di D. Berardino. 1995. An autosomal trisomi in cattle. *Genetic Selection Evolution*, 27: 437-476.
- Lounberg, D. 1990. Human Chromosome preparation. *The american Biology Teacher*. Vol 52 No. 2 February 1990.
- Mac Gregor H.C and J.M. Narley . 1983. *Working with animal Chromosome*. Pub. John Willey and Son. NY.
- Miyake, Y.I. 1985. *Cytogenetical Protocol On Domestic Animals*. IWATE .Univ. Japan. Personal Communication (correspondence).
- Mondal , NK. and S. Chakrabarti. 2007. A simpler, cheaper and quicker method to stusy somatic chromosome from goat, Capra

- hircus. j. Cytologia 72 (4). 419 – 425.
- Munne S., C. Marquez, A. Ring J. Garrisi and M. Alikami, 1998. Chromosome abnormalities in embryos obtained after conventional in vitro fertilization and ICSI. J. Fertil. Steril. 69: 904 – 908.
- Munoz, MG., D. Ocanto, ML. Madriz, R. Medina and D Vera. 1994. Incidence of 1/29 translocation in venezuelan Creole bulls. J. Theriogenology 41 (2): 379-372.
- Pires, R.M., R.H. Riechert and S. Kasahara. 1998. Cytogenetics Three Breeds of River Buffalo (*Bubalus bulalis* L). With Evidence of Fragile Site on The X Chromosome. Journal Theriogenology 49: 529 – 538, 1998.
- Schmutz S.M, JS. Moker V. Pavlyshyn, B. Haugen and EG. Clark. 1997. Fertility Effect of the 14; 20 Roberstonian translocation in cattle. J. Theriogenology Vol 47 (4) : 815 – 823.
- Villagomez, DAF and A. Pinton. 2008. Chromosomal abnormalities, meiotic behavior and fertility in domestic animals. J. cytogenetic and genome research. Vo. 120, No.1-2.: 12 pages.
- Viuff, D., P.J.M, Hendriksen, PL.A.M., Vos., S.J. Dieleman, B.M. Bibby, T. Greve, P.Hyttel and P.D. Thomsen, 2001. Chromosomal abnormalities and development kinetics in vivo-developed cattle embryos at day 3 tp 5 after ovulation.
- Yamanaka, H. 1977. The possibility of cattle chromosome classification, identified by G-Banding patterns. Jap Journal veterinaire Research 25: 52-58.
- Yoshizawa, M. 2003. Chromosomal abnormalities and Embryonic development into the blastocyst stage in mammalian embryos derived in vitro. J. Mammalian Ova Research 20 : 7 – 15.
- Yoshizawa, M. , H. Konno, S. Shu, S. Kageyama, E. Fukui, S. Muramatsu, S. Kim and Y. Araki. 1999. Chromosomal diagnosis in each individual blastomere of 5- to 10 cell bovine embryos derived from in vitro fertilization. J. Theriogenology, 51 : 1239 – 1250.