

胚胎质量和发育阶段对奶牛胚胎移植妊娠率的影响

郝海生, 杜卫华, 庞云渭, 赵学明, 赵善江, 邹惠影, 朱化彬

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: [目的] 为了评估胚胎质量和发育阶段对奶牛胚胎移植妊娠率的影响。 [方法] 使用 63 头青年奶牛作为供体进行超数排卵, 评估回收胚胎质量和发育阶段。选择 334 头青年奶牛作为受体鲜胚移植不同质量和发育阶段胚胎。对胚胎质量分布、发育阶段分布、不同质量胚胎和不同发育阶段胚胎移植 30 d 妊娠率进行统计分析。 [结果] 可用胚胎中 A 级胚胎比例 (60.78%) 显著高于 B 级和 C 级胚胎比例 (36.70% 和 2.52%) ($P < 0.05$); 致密桑椹胚比例 (54.36%) 显著高于早期囊胚, 囊胚和扩张囊胚比例 (18.35%, 25.0% 和 2.29%) ($P < 0.05$)。A 级和 B 级胚胎移植 30 d 妊娠率 (63.55% 和 64.35%) 显著高于 C 级胚胎移植 30 d 妊娠率 (44.44%) ($P < 0.05$); 致密桑椹胚、早期囊胚、囊胚和扩张囊胚移植 30 d 妊娠率差异不显著 ($P < 0.05$), 早期囊胚、囊胚移植 30 d 妊娠率高于致密桑椹胚、扩张囊胚移植 30 d 妊娠率 ($P < 0.05$)。 [结论] 选择不同发育阶段的 A 级和 B 级胚胎能够获得较高胚胎移植妊娠率, 增加早期囊胚和囊胚阶段胚胎移植数量能够提高胚胎移植妊娠率。

关键词: 奶牛; 超数排卵; 胚胎质量; 发育阶段; 胚胎移植

中图分类号: S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2023)03-0005-05

胚胎移植技术能够提高奶牛繁殖性能, 增加具有优良遗传性能高产奶牛数量^[1], 也能够用于公牛基因检测、疾病控制和提高屡配不孕牛繁殖效率等^[2]。自 20 世纪 70 年代商业化应用以来, 胚胎移植技术已经在奶牛育种中广泛使用。据国际胚胎移植协会 (IETS) 统计, 2020 年在奶牛上进行的体内、体外胚胎移植已经超过 100 万头次^[3]。近年来, 胚胎移植技术在国内规模牧场的牛群遗传改良和群体结构优化过程中也得到了进一步应用。牧场选择核心奶牛群中遗传性能排名前 5% ~ 10% 奶牛作为供体生产胚胎, 之后将胚胎移植到遗传性能排名靠后的受体奶牛中, 提高了优秀母牛繁殖效率。

在大规模牛胚胎移植中, 超排反应差异^[4]和妊娠率差异^[5]直接影响着胚胎移植效率。以往研究中, 移植部位、移植难易程度 (子宫颈通过或胚胎移植时间)、胚胎发育阶段和质量、季节、受体胎次、冷冻以及营养状况等因素都会影响胚胎移植妊娠率^[5-8]。进一步提高胚胎移植妊娠率, 不仅能够提高胚胎利用效率, 也能够减少维持未妊娠受体相关的

饲养成本, 提高牧场效益。本研究通过研究胚胎质量和发育阶段对奶牛胚胎移植妊娠率的影响, 期望能够为提高牧场胚胎移植效率提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 供体牛群

供体牛群由宁夏某奶牛场提供。供体牛为 13 ~ 15 月龄青年奶牛, 体况评分为 3 ~ 3.5, 共计 63 头。超排处理前, 所有供体单独饲喂 1 个月。

1.2 试验药品与试剂

FSH (400.0 mg NIH/瓶)、CUE-MATE 孕酮阴道栓 (1.56 g 孕酮/支)、冲胚液购自 Vetoquinol 公司; 戈那瑞林 (GnRH, 100.0 ug/支)、氯前列醇 (PG, 0.322 mg/支) 购自齐鲁动物保健品有限公司; 冲胚管购自 Minitube 公司。

1.3 供体超排

供体超排采用孕酮-FSH 方案。超排具体方案为: 第 0 天埋植 CUE-MATE 孕酮阴道栓。第 5 天至第 8 天每天 2 次间隔 12 h 肌肉注射 FSH, FSH 总剂

收稿日期: 2023-02-02 修回日期: 2023-03-06

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程 (ASTIP-IAS06), 中国农业科学院科协同创新 (奶牛高产高效技术集成研究与示范应用)

作者简介: 郝海生 (1977—), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事家畜繁殖技术研究。

* 通讯作者: 朱化彬 (1965—), 男, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事家畜胚胎工程与繁殖技术研究。

量为260.0 mg。同时,第7天上午和下午各肌肉注射0.6 mg PG,下午撤除CUE-MATE孕酮阴道栓;第9天观察供体发情,供体发情12 h和24 h后分别进行1次人工授精,每次人工授精使用2支细管冷冻精液。

1.4 受体同期发情

选择13~15月龄青年奶牛为受体。同期发情具体方案为:在供体超排处理第0天时受体肌肉注射100.0 μ g GnRH,第7天肌肉注射0.6 mg PG,第9天肌肉注射100.0 μ g GnRH。采用尾根涂蜡结合发情观察记录受体发情情况。

1.5 胚胎回收

人工授精后第7天采用非手术方法回收胚胎,每侧子宫使用200.0~250.0 mL冲胚液。胚胎回收液收集到集卵杯中。

1.6 胚胎鉴定与评估

在体视显微镜下对回收胚胎进行鉴定与评估。可用胚胎质量分为A级、B级和C级;可用胚胎发育阶段分为致密桑椹胚,早期囊胚,囊胚和扩张囊胚。

1.7 胚胎移植与妊娠诊断

选择经直肠检查卵巢存在直径 ≥ 15.0 mm新生黄体的受体进行移植。移植后30天使用B超对受体进行妊娠检查。

1.8 测定指标

1.8.1 胚胎生产与移植数据 胚胎回收后,统计供体胚胎生产与移植情况,包括:可用胚胎数、平均可用胚胎数、移植受体头数、妊娠受体头数和30 d移植妊娠率。

1.8.2 可用胚胎质量分布数据 胚胎鉴定评估后,统计可用胚胎质量分布情况,包括:A级胚胎数/A

级胚胎比例(A级胚胎数/可用胚胎数)、B级胚胎数/B级胚胎比例(B级胚胎数/可用胚胎数)、C级胚胎数/C级胚胎比例(C级胚胎数/可用胚胎数)。

1.8.3 可用胚胎发育阶段数据 胚胎鉴定评估后,统计可用胚胎发育阶段分布情况,包括:致密桑椹胚数/致密桑椹胚比例(致密桑椹胚数/可用胚胎数)、早期囊胚数/早期囊胚比例(早期囊胚数/可用胚胎数)、囊胚数/囊胚比例(囊胚数/可用胚胎数)和扩张囊胚数/扩张囊胚比例(扩张囊胚数/可用胚胎数)。

1.8.4 不同质量可用胚胎移植数据 胚胎移植后,统计不同质量胚胎移植30 d妊娠率,包括:A级胚胎移植妊娠率、B级胚胎移植妊娠率和C级胚胎移植妊娠率。

1.8.5 不同发育阶段胚胎移植数据 胚胎移植后,统计不同发育阶段胚胎移植30 d妊娠率,包括:致密桑椹胚移植妊娠率、早期囊胚移植妊娠率、囊胚移植妊娠率和扩张囊胚移植妊娠率。

1.9 统计与分析

使用SPSS 25.0对可用胚胎质量分布、胚胎发育阶段分布、不同质量胚胎移植30 d妊娠率和不同发育阶段胚胎移植30 d妊娠率相关数据进行卡方检验,结果用百分比表示,以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 胚胎生产与移植结果

63头供体超排获得436枚可用胚胎,平均可用胚胎数6.9枚/头,移植新鲜可用胚胎334头次,移植受体30 d妊娠率为63.47%。胚胎生产与胚胎移植结果见表1。

表1 胚胎生产与移植情况

头数/头	可用胚胎数/枚	平均可用胚胎数/枚	移植头次/头	妊娠头数/头	30天妊娠率/%
63	436	6.9	334	212	63.47

2.2 可用胚胎质量与发育阶段分布情况

可用胚胎质量评估与分布情况见图1—3和表2。436枚可用胚胎中,A级胚胎265枚,B级胚胎

160枚,C级胚胎11枚。A级胚胎比例显著高于B级和C级胚胎比例($P < 0.05$)。

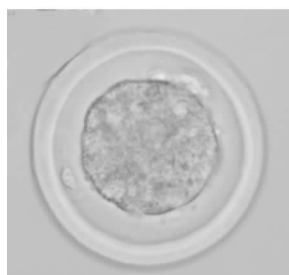


图1 A级胚胎

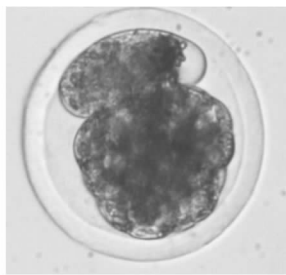


图2 B级胚胎

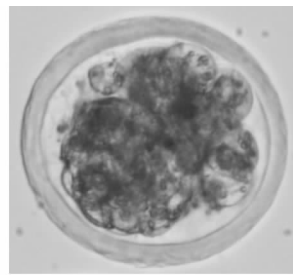


图3 C级胚胎

表 2 可用胚胎质量分布情况

胚胎质量	胚胎数/枚	比例分布/%
A 级	265	60.78 ^a
B 级	160	36.70 ^b
C 级	11	2.52 ^c

注:同列数据肩标小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$),下同

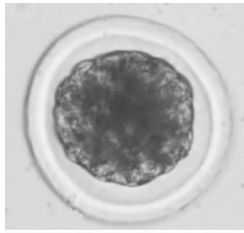


图 4 致密桑椹胚

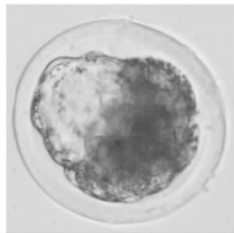


图 5 早期囊胚

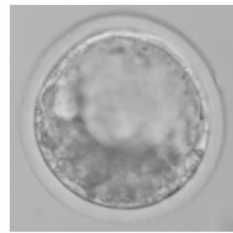


图 6 囊胚

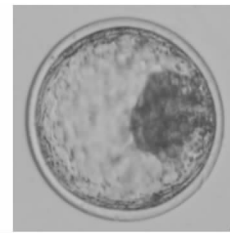


图 7 扩张囊胚

表 3 可用胚胎发育阶段分布情况

胚胎阶段	胚胎数/枚	比例分布/%
致密桑椹胚	237	54.36 ^a
早期囊胚	80	18.35 ^b
囊胚	109	25.00 ^b
扩张囊胚	10	2.29 ^c

注:同列数据肩标小写字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$),下同

2.3 不同质量胚胎移植妊娠率

不同质量胚胎移植 30 d 妊娠率见表 4。A 级和 B 级胚胎移植 30 d 妊娠率显著高于 C 级胚胎移植 30 d 妊娠率 ($P < 0.05$), A 级胚胎 30 d 妊娠率与 B 级胚胎移植 30 d 妊娠率差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 4 不同质量胚胎移植 30 d 妊娠率

胚胎质量	移植头数	妊娠头数	30 天妊娠率
	/头	/头	/%
A 级	203	129	63.55 ^a
B 级	122	79	64.75 ^a
C 级	9	4	44.44 ^b

2.4 不同发育阶段胚胎移植妊娠率

不同发育阶段胚胎移植 30 d 妊娠率见表 5。致密桑椹胚、早期囊胚、囊胚和扩张囊胚移植 30 d 妊娠率之间差异不显著 ($P > 0.05$);早期囊胚、囊胚移植 30 d 妊娠率高于致密桑椹胚、扩张囊胚移植 30 d 妊娠率 ($P > 0.05$)。

表 5 不同发育阶段胚胎移植 30 d 妊娠率

胚胎阶段	移植头数	妊娠头数	30 d 妊娠率
		/头	/%
致密桑椹胚	186	113	60.75 ^a
早期囊胚	54	36	66.67 ^a
囊胚	84	57	67.86 ^a
扩张囊胚	10	6	60.00 ^a

可用胚胎发育阶段评估与分布情况见图 4-7 和表 3。436 枚可用胚胎中,致密桑椹胚 237 枚,早期囊胚 80 枚,囊胚 109 枚,扩张囊胚 10 枚。致密桑椹胚比例显著高于早期囊胚,囊胚和扩张囊胚比例 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 胚胎质量对胚胎移植妊娠率的影响

胚胎质量是影响胚胎移植妊娠率的重要因素^[9]。本研究中,A 级和 B 级胚胎移植妊娠率显著高于 C 级胚胎移植妊娠率,这与许瑞锋等^[10]和 Rodrigues 等^[11]研究结果一致,表明选择 A 级和 B 级胚胎是保证胚胎移植有效性,提高移植妊娠率的重要前提^[12-13]。有研究表明胚胎移植妊娠率会随着胚胎质量下降而降低^[5,7]。本研究未发现 A 级和 B 级胚胎移植妊娠率之间存在显著差异,这可能与不同研究中胚胎质量评估标准存在差异有关。目前胚胎质量分级形态学评估主要是基于 IETS 制定的标准,质量接近胚胎的等级划分容易受到主观影响,造成不同研究中分级相同胚胎并不一定在功能上都具有相同发育能力^[12]。准确的胚胎质量评估对胚胎移植妊娠率成功至关重要,胚胎评估人员需要进行大量和重复的实践练习,以确保质量好的胚胎被挑选出,同时防止未受精卵错误地被评估为可用胚胎用于移植。需要注意的是,在平皿内滚动胚胎是胚胎质量评估一个非常重要的操作步骤。在滚动胚胎过程中通过显微镜能够准确判断胚胎细胞团所有细胞情况以及透明带完整情况。因此,牧场开展胚胎移植工作时选择 A 级和 B 级胚胎均能够获得较高移植妊娠率。

3.2 胚胎发育阶段对移植妊娠率的影响

牛体内胚胎回收一般是在供体配种后第 6—8 天进行,因回收时间不同胚胎发育阶段可能会存在差异^[2]。供体配种后第 7 天回收的胚胎主要是致密桑椹胚、早期囊胚和囊胚^[1,6],本研究结果与上述结论一致,其中致密桑椹胚数量最多,比例超过了 50.0%。多数研究表明,胚胎发育阶段对胚胎移植妊娠率没有显著影响^[14-15]。本研究结果也表明致密桑椹胚、早期囊胚、囊胚和扩张囊胚移植后妊娠率

均没有显著降低,均在 60.0% 以上。需要注意的是,在不考虑胚胎质量分级情况下,早期囊胚和囊胚移植妊娠率高于致密桑椹胚和扩张囊胚移植妊娠率。类似的结果也在绵羊^[16]和猪^[17]上观察到。这一情况的出现可能与胚胎发育阶段和子宫内环境之间的同步性有关。部分桑椹胚期胚胎在向囊胚发育过程中存在发育延迟,导致移植到受体子宫内后与受体子宫环境不同步,生存能力降低。相反,囊胚期胚与受体子宫环境同步性更高,移植到受体子宫内后生存能力较强。另外,早期囊胚和囊胚阶段妊娠率较高可能也与 DEGs(差异表达基因)的表达上调与下调有关^[18]。研究表明,移植后囊胚中特定受体基因上调能够使胚胎更好地参与与子宫内膜或自身的细胞-细胞之间相互作用,或对母体或胚胎产生的调节信号作出反应。如与细胞紧密连接形成有关的上调基因 CLDN4^[19];与滋养层附着于子宫内膜有关的上调基因 EPHA5^[20];与胚胎移植后更广泛 ICM 分化有关的大量神经组织相关上调基因。同时,移植后存活囊胚胚胎存在着参与能量代谢相关的下调基因,如 CYTC, 基因编码复合体 I 蛋白质基因 (ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L 和 ND5), 复合体 III 中的基因 (CYTB), 复合体 IV 中的基因 (COX1 和 COX3) 和复合体 V 中的基因 (ATP6) 等,这些基因表达下调导致移植后存活胚胎中细胞激活的降低或受到抑制。因此,牧场开展胚胎移植时,可以考虑适当推迟胚胎回收时间,增加回收胚胎中早期囊胚和囊胚数量,提高受体移植妊娠率。

3.3 胚胎质量和发育阶段对早期胚胎死亡的影响

胚胎质量和发育阶段能够影响胚胎早期死亡^[21-22],更高质量胚胎有更高的存活机会^[23],这可能与更高质量胚胎能够分泌更多干扰素- τ (IFN- τ) 有关^[24-26]。IFN- τ 表达时间在囊胚孵化期至胚胎附着于子宫内膜上皮之前,随着囊胚不断延伸,IFN- τ 分泌量逐渐增加^[27]。IFN- τ 作为旁分泌因子与子宫内膜细胞上相关受体结合,抑制雌激素受体和孕酮受体基因转录,下调催产素受体表达,使催产素不能诱导 PGF2 α 脉冲释放,从而阻止黄体溶解维持妊娠^[28-29]。此外,胚胎早期死亡也可能与妊娠检查过程引起的受体应激反应有关^[30]。研究表明,多数胚胎早期死亡发生在供体配种后 18 d 内^[31],42 d 后的早期胚胎死亡率在 5% 到 8% 之间^[32]。因此,本研究下一步需要统计胚胎移植后 30 ~ 60 d 之间早期胚胎死亡率,以确定不同质量和不同发育阶段胚胎对早期死亡的影响,为提高牧场胚胎移植后的受体管理水平提供数据支持。

4 结论

综上所述,统一胚胎质量评估标准,选择不同发

育阶段 A 级和 B 级胚胎能够获得较高胚胎移植妊娠率;适当推迟胚胎回收时间能够增加早期囊胚和囊胚数量,提高胚胎移植妊娠率。

参考文献:

- [1] HASLER JF. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences [J]. Theriogenology, 2014, 81(1): 152-169.
- [2] MAPLETOFT RJ, HASLER JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review [J]. Rev Sci Tech, 2005, 24(1): 393-403.
- [3] Viana J. 2020 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals [J]. Embryo Technology Newsletter, 2021, 39(4): 1-15.
- [4] Bó G A, MAPLETOFT RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle [J]. Theriogenology, 2014, 81(1): 38-48.
- [5] FERRAZ PA, BURNLEY C, KARANJA J, et al. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States [J]. Theriogenology, 2016, 86(7): 1834-1841.
- [6] LEROY JLMR, OPSOME G, DE VliegHER S, et al. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows [J]. Theriogenology, 2005, 64(9): 2022-2036.
- [7] Bényei B, KOMLóSIL, PéCSI A, et al. The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment [J]. Anim Reprod Sci, 2006, 93(3-4): 268-279.
- [8] ROPER DA, SCHRICK FN, EDWARDS JL, et al. Factors in cattle affecting embryo transfer pregnancies in recipient animals [J]. Anim Reprod Sci, 2018, 199: 79-83.
- [9] Bó GA, MAPLETOFT RJ. Evaluation and classification of bovine embryos [J]. Anim Reprod, 2013, 10(3): 344-348.
- [10] 许瑞峰, 殷宗俊, 龙学仁, 等. 解冻后胚胎质量对移植妊娠率的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(9): 56-57.
- [11] RODRIGUES M, BONOTTO A, ACOSTA D, et al. Effect of oestrous synchrony between embryo donors and recipients, embryo quality and state on the pregnancy rate in beef cattle [J]. Reprod Domest Anim, 2018, 53(1): 152-156.
- [12] CHEBEL RC, DEMÉTRIO DGB, METZGER J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds [J]. Theriogenology, 2008, 69(1): 98-106.
- [13] NISHIGAI M. The development and prevalence of the transfer technique for frozen-thawed embryos of Japanese black beef cattle in Tochigi Prefecture [J]. J Reprod Dev, 2003, 49(1): 23-36.
- [14] Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle [J]. Theriogenology, 2001, 56(9): 1401-1415.
- [15] SPELL AR, BEAL WE, CORAH LR, et al. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle [J]. Theriogenology, 2001, 56(2): 287-297.
- [16] KING CAF, OSBORNE D, GRUPEN CG. Multiple ovulation and embryo transfer in sheep: effects of embryo developmental stage and quality on viability in vivo under farm conditions [J]. Aust Vet J 2022, 100(9): 451-458.
- [17] WILMUT I, SALES DI, Ashworth CJ. The influence of variation

- in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals [J]. *Theriogenology*, 1985, 23(1):107-119.
- [18] Zolini AM, Block J, Rabaglino MB. Genes associated with survival of female bovine blastocysts produced in vivo [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 382(3):665-678.
- [19] MORIWAKI K, TSUKITA S, FURUSE M. Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos [J]. *Dev Biol*, 2007, 312(2):509-522.
- [20] FUJII H, TATSUMI K, KOSAKA K, et al. Eph-ephrin A system regulates murine blastocyst attachment and spreading [J]. *Dev Dyn*, 2006, 235(12):3250-3258.
- [21] TAVERNE MAM, BREUKELMAN SP, PETENY Z, et al. The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of in vitro produced embryos [J]. *Reprod Nutr Dev*, 2000, 42(6):613-624.
- [22] SaRTORI R, GüMEN A, GUENTHER JN, et al. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows [J]. *Theriogenology*, 2006, 65(7):1311-1321.
- [23] FAIN PW, MILES JR, FARIN CE. Pregnancy loss associated with embryo technologies in cattle. In: *Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress*, Canada. 2004.
- [24] MANN GE, LAMMING GE. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle [J]. *Reprod Domest Anim*, 1999, 34(3-4):269-274.
- [25] MANN GE, FRAY MD, LAMMING GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow [J]. *Vet J*, 2006, 171(3):500-503.
- [26] WADE M, ROCHE JF, CROWE MA, et al. Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers [J]. *Reprod Fert Develop*, 2008, 20(3):368-375.
- [27] 郭延生, 陶金忠. 基于 LC-Q/TOF-MS 代谢组学方法筛选奶牛妊娠识别阶段乳样生物标志物的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(8):1633-1641.
- [28] 程蕾, 王定发, 刘晓华, 等. ISG1 和 OAS 在奶牛早期妊娠阶段外周血中的表达规律 [J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(1):77-84.
- [29] 李瑞婷, 靳方圆, 杨洪娟, 等. 干扰素- τ 在反刍动物早期妊娠胚胎着床过程中的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016, 3(5):87-89.
- [30] KASIMANICKAM RK, HALL JB, ESTILL CT, et al. Flunixin meglumine improves pregnancy rate in embryo recipient beef cows with an excitable temperament [J]. *Theriogenology*, 2018, 107(1):70-77.
- [31] AYALON N. A review of embryonic mortality in cattle [J]. *J Reprod Fertil*, 1978, 54(2):483-493.
- [32] Farin PW, Farin CE. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro; survival and fetal development [J]. *Biol Reprod*, 1995, 52(3):676-682.

Effect of Embryo Quality and Development Stages on Pregnancy Rate of Cow Embryo Transfer

HAO Hai-sheng, DU Wei-hua, PANG Yun-wei, ZHAO Xu-eming, ZHAO Shan-jiang,
ZOU Hui-ying, ZHU Hua-bin*

(*Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193 China*)

Abstract: [Objective] To evaluate the effect of embryo quality and developmental stages on the pregnancy rate of embryo transfer in recipients. [Method] 63 dairy heifers were superovulated and the quality and developmental stages of collected embryos were evaluated. 334 heifers were selected as recipients for fresh embryo transfer of embryos of different quality and developmental stages. Statistical analysis was conducted on the distribution of embryo quality, developmental stage distribution, and 30 day pregnancy rate of embryo transfer at different quality and developmental stages. [Result] [Result] The proportion of A – grade embryos (60.78%) in available embryos was significantly higher than that of B – grade and C – grade embryos (36.70% and 2.52%) ($P < 0.05$). The proportion of compact morula (54.36%) was significantly higher than that of early blastocyst, blastocyst and expanded blastocyst (18.35%, 25.0% and 2.29%) ($P < 0.05$). On day 30, the pregnancy rate of grade A and B embryos (63.55%, 64.35%) were significantly higher than that of grade C embryos (44.44%) ($P < 0.05$). There were no significant difference in the 30 – day pregnancy rate among compact morula, early blastocyst, blastocyst and expanded blastocyst transplantation (60.75%, 66.67%, 67.86% and 60.00%) ($P > 0.05$). The 30 – day pregnancy rate of early blastocyst and expanded blastocyst transplantation was higher than that of dense morula and expanded blastocyst transplantation ($P < 0.05$). [Conclusion] The selection of grade A and B embryos at different embryonic developmental stages can achieve a higher embryo transfer pregnancy rate. Increasing the number of early blastocysts and blastocyst transfers could improve embryo transfer pregnancy rates.

Key words: dairy; superovulation; embryo quality; developmental stages; embryo transfer