



## Uso de sêmen refrigerado bovino: quebrando paradigmas

*Colled bovine semen: breaking paradigms*

**Juliana Corrêa Borges Silva<sup>1,‡</sup>, Márcio Ribeiro Silva<sup>2</sup>, Renato Guimarães da Silva<sup>3</sup>, Eriklis Nogueira<sup>1</sup>,  
Luiz Orcírio Fialho de Oliveira<sup>4</sup>, Urbano Gomes Pinto de Abreu<sup>1</sup> Alessandra Corallo Nicacio<sup>4</sup>,  
Walvonvitis Baes Rodrigues**

<sup>1</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

<sup>2</sup>Melhore Animal Consultoria Ltda, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>3</sup>BR PEC Agropecuária, Corumbá, MS, Brasil.

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

### Resumo

A utilização do sêmen refrigerado (SR) cresce a cada dia, no entanto mais estudos são necessários para validar e viabilizar o uso em massa desta biotécnica, garantindo aumento dos índices de prenhez, quando utilizamos sêmen refrigerado comparado com o sêmen congelado de um mesmo touro. A membrana plasmática é a parte da estrutura do espermatozoide mais susceptível a modificações durante o processo de criopreservação, as quais são causadas por alterações de temperatura induzidas sobre as células (curva de resfriamento e congelamento, além do processo de pós-descongelamento), ou seja, em última análise, ocorre a diminuição da viabilidade das células, principalmente, porque a membrana espermática é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lípidos e proteínas. Assim, quanto menor for o processamento, mais células viáveis estarão disponíveis no momento da fecundação e, conseqüentemente, aumentará a prenhez. Na tentativa de diminuir as perdas celulares, o uso do sêmen refrigerado ressurge com a possibilidade de aumentar a prenhez nos protocolos de IATF.

**Palavras-chave:** membrana plasmática, prenhez, processamento de sêmen, qualidade seminal, touro.

### Abstract

*The use of cooled semen (CS) has been increase every day, however more researches are needed to validate and spread this biotech, improves pregnancy rates higher than when compared to the frozen semen of same bull. Plasma membrane is the part of the sperm structure most susceptible to modifications during the cryopreservation process caused by changes in temperature that the cell undergoes (cooling and freezing curve besides the process of post-thawing), that is, in the last analysis, there is a decrease in cell viability, mainly because the sperm membrane is submitted to structural rearrangements involving lipids and proteins. Thus, the smaller the processing, the more viable cells will be available at the time of fertilization and consequently, the pregnancy will increase. In an attempt to decrease cell losses, the use of cooled semen resurfaces with the possibility of increasing pregnancy in the IATF protocols.*

**Keywords:** plasma membrane, pregnancy rate, sperm quality, process semen, bull.

### Introdução

O uso de sêmen refrigerado (SR) em bovinos, por não ser convencional da espécie, ainda terá que quebrar muitos paradigmas, por mais que seja uma prática antiga. O uso dos protocolos de IATF tornou possível a utilização do SR, em escala e com grande potencial de expansão. Ou seja, é possível programar a coleta do sêmen de um determinado touro e inseminar fêmeas protocoladas com aumento significativo de prenhez (10%,  $P < 0,05$ ), quando comparado ao sêmen congelado do mesmo touro (Silva et al., 2017; Borges-Silva et al., 2016; Crespilho et al., 2012). Por ser uma linha de pesquisa abandonada desde a década de 40, após a descoberta do glicerol, muitos são os questionamentos em relação aos benefícios-custos, qualidade de mão de obra envolvida, padronização do processamento, tempo de viabilidade espermática, diluidor de escolha, logística para sua distribuição, equipamentos necessários e, principalmente, índices de prenhez. Poucos são os trabalhos disponíveis em literatura com o uso em IATF, mas o número vem crescendo, pois, a maioria tem demonstrado resultados promissores com a adoção desta biotécnica (Resende et al., 2018; Borges-Silva et al., 2016; Crespilho et al., 2012). Assim, o desenvolvimento de experimentos pode contribuir para a melhoria dos índices do SR, aumentando sua longevidade e facilitando a adoção em relação à logística, por exemplo. Importante destacar a conscientização tanto dos produtores quando dos responsáveis técnicos da escolha do reprodutor a ser utilizado, pois devem ser escolhidos touros reprodutores geneticamente avaliados. Desse modo, aumentar a taxa de natalidade, juntamente com a qualidade genética da progênie, é o ponto importante na recomendação para adoção dessa prática.

Nesta revisão serão abordados os aspectos que interferem na qualidade dos processos do sêmen congelado e refrigerado, bem como, os resultados obtidos com SR nos protocolos de IATF.

<sup>‡</sup>Correspondência: juliana.correa@embrapa.br

Recebido: 27 de março de 2019

Aceito: 10 de abril de 2019



### Processamento do sêmen congelado *versus* refrigerado

O sêmen de boa qualidade é fator de fundamental importância para o sucesso da técnica de inseminação artificial, seja ela pela observação de cio, ou em tempo fixo, por isso seu processamento deve preservá-lo ao máximo. Os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição do número de espermatozoides viáveis por dose (Amann e Pickett, 1987; Watson, 1995), e ao diminuir ou cessar qualquer tipo de injúria que comprometa a viabilidade espermática, haverá a possibilidade de melhorar os índices reprodutivos, e difundir o uso das biotecnologias, como Transferência de Embriões (TE), Fertilização *in vitro* (FIV), Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) e utilização do sêmen sexado, já que todas utilizam o sêmen criopreservado.

A criopreservação induz extensivas modificações biofísicas e bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide, que acarretam diminuição do potencial de fertilidade da célula, associado com a redução da motilidade e da viabilidade espermática, integridade de membrana, quantidade de antioxidante e funções espermáticas (Borges et al., 2011).

É durante o período de resfriamento (20°C e 5°C) que mudanças irreversíveis ocorrem à membrana plasmática dos espermatozoides, devido à ruptura e perdas de seus arranjos celulares (Quinn et al., 1980; Watson, 1995). Essa fase de transição caracteriza-se pela passagem da membrana plasmática do estágio líquido para o estágio cristalino (gel), sendo o período principal de entrave no sucesso do congelamento. Diminuição da produção de energia (movimento circular ou perda prematura de motilidade), e aumento da permeabilidade da membrana estão associadas a essas alterações (Watson, 1995; Watson, 2000).

A sensibilidade ao choque térmico varia de acordo com o grau de maturação dos espermatozoides, com a espécie e com a qualidade e quantidade do plasma seminal, podendo ser determinada pelo conteúdo de colesterol na membrana e o grau de saturação dos ácidos graxos (Watson, 1981).

Os meios diluidores são constituídos de substâncias que permitem a preservação da motilidade e da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, por estabilizar o pH do meio, neutralizar produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides, de forma a protegê-los contra o choque térmico, manter o equilíbrio eletrolítico e pressão osmótica compatível com a dos espermatozoides, atuar como fonte de energia, estabilizar sistemas enzimáticos e ainda inibir o crescimento bacteriano (England, 1993; Pickett e Amann, 1993). Estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver meio, que atenda todas essas qualidades, fazendo com que o mínimo de espermatozoides seja perdido durante o processo de refrigeração e/ou de criopreservação.

O tipo de fosfolipídios e a quantidade de proteínas presentes na membrana plasmática também influenciam na sensibilidade ao choque térmico, sendo que espécies que possuem maior proporção de fosfatidilcolina:fosfatidiletanolamina são mais resistentes, enquanto que espécies que possuem maior conteúdo de proteína são menos resistentes (Parks e Lynch, 1992).

A curva de congelamento (0 a -196°C) é de extrema importância na manutenção da integridade celular, pois se a mesma for muito rápida, não há tempo para que ocorra a desidratação dos espermatozoides, possibilitando a formação de gelo intracelular, prejudicial à célula. Em casos de curva de congelamento lenta, haverá a desidratação dos espermatozoides impedindo a formação de gelo intracelular: porém a alta concentração de solutos também pode causar danos à célula (Watson, 1995).

Além das lesões sofridas pela membrana plasmática durante o congelamento, também ocorrem danos durante o processo de reaquecimento da célula após o descongelamento, uma vez que a membrana é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lipídios e proteínas e a passagem rápida de água para o interior da célula pode causar o rompimento das membranas (Watson, 1995; Holt, 2000). Assim, a fase de descongelamento (-196°C para 35°C) é tão importante quanto à de congelamento, na formação de metabólitos do oxigênio e na manutenção da viabilidade celular.

Embora existam inúmeras vantagens e aplicações, é fato que o processo de criopreservação induz danos em quase 50% das células (Gravance et al., 1998). Sendo assim, a hipótese a ser testada seria que as células espermáticas sofreriam menos injúria com o uso do SR chegando a 5°C, e não necessitando ser descongelado e reaquecido, o que aumentaria a prenhez. Apesar de ser um raciocínio lógico, precisaria ser cientificamente comprovado, em protocolos de IATF.

Nas espécies como equinos, caninos, suínos, caprinos e ovinos os estudos envolvendo SR são comuns. Eles abordam composição do diluidor, tempo e temperatura de armazenamento, curvas de refrigeração e taxa de prenhez. No entanto, somente na Nova Zelândia e Irlanda existe o uso “rotineiro” do SR bovino e de forma comercial. Inclusive, nos últimos anos, os trabalhos com SR aumentaram em função da maior eficiência dos protocolos de IATF direcionando para melhores índices de prenhez do gado leiteiro nesses países (Yang et al., 2018). Cabe ressaltar, que o objetivo desses países é muito diferente do nosso. No caso deles, o objetivo é intensificar o uso de um mesmo reprodutor, visto que a demanda de um único animal é imensa para a produção de leite, logo a dose inseminante é muito baixa (1 a 2 milhões por palheta fina) com os índices iguais ao do sêmen criopreservado. No nosso caso, o objetivo é intensificar o uso do reprodutor aumentando a prenhez com a mesma concentração espermática que o sêmen congelado nos protocolos de IATF.



### **Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)**

A inseminação artificial (IA) em bovinos é a biotécnica aplicada à reprodução com maior difusão e impacto no melhoramento genético de animais de exploração zootécnica. Essa técnica possui importantes vantagens como: melhoramento do rebanho em menor tempo e baixo custo por meio da utilização de sêmen de reprodutores comprovadamente provados para a produção de leite e carne; controle de doenças que pela monta natural poderiam ser transmitidos às vacas; utilização de touros com problemas adquiridos e impossibilitados de efetuarem a monta; obtenção de maior número de descendentes de um reprodutor; padronização do rebanho; nascimento de filhos após a morte do pai, face à possibilidade de congelamento e estocagem de sêmen, utilização de cruzamento, entre outras. Com isso, a utilização da IA apresenta inúmeras vantagens tornando a relação custo/benefício bastante lucrativa. Quando o assunto é IATF, outras vantagens se sobressaem como: não observação de cio, indução da ciclicidade em vacas em anestro, redução do intervalo de partos, homogeneidade dos lotes, sincronização dos nascimentos, racionalização da mão de obra e inseminação com dia e hora marcados.

O número de bovinos inseminados, embora tenha aumentado de 5% para ~14%, sendo a maioria (~86%) de IATF (Baruselli, 2019), ainda é baixo se pensarmos no montante que poderia ser alcançado. Ou seja, o uso de touros, em monta natural, muitas vezes com valor reprodutivo e genético questionáveis, ainda é a maneira predominante de reprodução utilizada no País. A IA é a principal ferramenta para aumentar a produção, e se empregado o uso do sêmen de touros melhoradores, avaliados geneticamente, aumenta também a produtividade. Por isso, é sempre indicado o uso de sêmen de um reprodutor bem avaliado para os interesses zootécnicos (ganho de peso, desmama, precocidade, etc). A IATF resolveu, parcialmente, as dificuldades encontradas com a técnica tradicional, promovendo o avanço na uso de IA no Brasil, especialmente em áreas com predomínio de sistemas extensivos de cria, como o Pantanal, com taxas médias de prenhez cada vez mais satisfatórias. No entanto, existem muitos fatores que influenciam seus resultados, tais como: estrutura da fazenda (mangueiro, cerca, divisão de lotes), categoria animal (nulíparas, primíparas e múltipas), escore de condição corporal, tamanho do lote, protocolo hormonal, inseminador e, particularmente, a qualidade do sêmen (Silva et al., 2017).

A utilização da IATF tomou espaço considerável na pecuária de corte, aumentando significativamente a cada ano. Em seu histórico de 2002 a 2018 observamos que houve aumento de 1% para 86,3% em 16 anos (Baruselli, 2019), podendo expandir ainda mais.

O aspecto fundamental da IATF em relação ao SR é o momento exato da inseminação, podendo assim controlar e ajustar o tempo de coleta do sêmen em função dos lotes agendados para a inseminação. Os profissionais que atuam na prestação de serviço de IATF poderão agregar ao seu portfólio o processamento do SR.

### **Resultados com sêmen refrigerado bovino**

O SR não é submetido ao processo de congelamento e descongelamento e, portanto, sofre menos lesões, resultando em maior viabilidade, aumentando a capacidade de fertilizar e de fato aumentando a prenhez quando comparado com o sêmen congelado do mesmo touro. Além disso, o momento exato de ovulação, após protocolo de IATF, não é conhecido, ou seja, em outras palavras, há uma janela de tempo, desconhecida, entre inseminação e ovulação, que pode diminuir a chance de fecundação quando um sêmen de qualidade inferior é utilizado, conseqüentemente, quando se utiliza sêmen com viabilidade prolongada, como no caso do sêmen refrigerado, as fêmeas acasaladas por IATF possuem melhores taxas de fertilidade.

Há poucos estudos com bovino e todos variam em relação à metodologia, necessitando de mais experimentos controlados, para comparações e validações. Por exemplo, quando se avalia taxa de prenhez comparando sêmen congelado e refrigerado, qual a concentração espermática utilizada (Bucher et al., 2009), o tipo de palheta, a composição do diluidor (Verberckmoes et al., 2005), o tempo e temperatura utilizados, o processo de refrigeração e de utilização das palhetas (se aquece ou não antes da IATF?), protocolo hormonal, quantidade de touros e fêmeas, efeito touro mesmo com sêmen refrigerado, etc. Ou seja, muitos são os fatores que devem ser levados em conta quanto comparamos os poucos trabalhos na área. O que todos têm em comum é a ferramenta da IATF e sua avaliação prévia dentro dos padrões do Manual do CBRA (CBRA, 2013).

De forma resumida, todos os trabalhos verificaram aumento significativo de prenhez, utilizando SR com 24 horas a 5°C, comparado ao sêmen criopreservado, respectivamente [(59,9% vs 49,4% n=836) Borges-Silva et al., 2016; (61,49% vs 45,71% n=349) Crespilho et al., 2012; (51% vs 41% n=494) Papa et al., 2015; (64,5% vs 44,7% n=152) Resende et al., 2018; (63,8% vs 53% n=400) Comunicação Pessoal]. Já os trabalhos divergem quanto a taxa de prenhez se utilizado por 48 horas a 5°C comparado com o sêmen congelado, sendo que dos dois experimentos na literatura, um encontrou diminuição da prenhez em relação ao sêmen congelado (Crespilho et al., 2014), e o outro índice similar ao congelado (Tarragó, 2017). Mas cabe ressaltar que os diluidores e concentração espermática foram diferentes. No entanto, nossos estudos, não consideram mais a comparação com o sêmen congelado, visto que já foi verificada diferença conforme a hipótese inicial, e o sêmen refrigerado está sendo comparado em diferentes momentos 24, 48, 72 em relação à prenhez. O sêmen congelado comercial, de reprodutor com fertilidade atestada serviu de controle em relação ao SR. Até agora, os resultados têm mostrado mesmo índice de prenhez com 24 (52,6% [119/226]) e 48 (52,1% [123/236]) horas de refrigeração (dados não publicados). Outro resultado interessante é que o diluidor pode conter glicerol (7%) sem afetar a prenhez (Papa et al., 2015; Silva et al., 2016).



Assim, médicos veterinários podem utilizar o diluidor comercial, que contem glicerol em sua composição, evitando o trabalho de preparo do meio e/ou necessidade de retirada do glicerol.

Verificou-se que houve efeito do touro ( $P < 0,05$ ) nos resultados obtidos na estação de monta de 2017-2018 variando de 36% a 71% de prenhez com 24 horas e 27,7% a 65% de prenhez com 48 horas, dentre os sete touros utilizados na inseminação de 579 fêmeas. Isso demonstra que o efeito touro é importante do mesmo modo que ocorre no sêmen congelado e que conhecer esses indivíduos previamente é importante para a obtenção de bons resultados.

### Considerações finais

O SR terá espaço crescente e considerável dentro do manejo reprodutivo, tanto para os profissionais que atuam na prestação de serviço de IATF, quanto para os Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPP), pois as principais vantagens relacionadas com seu uso são a otimização de touros, menor custo do sêmen e armazenamento e, sua praticidade e aumento de prenhez na IATF, unânime em todos os experimentos com 24 horas de refrigeração. Outra vantagem importante do SR é a possibilidade do produtor investir na compra de animais melhoradores (uso de touros geneticamente superiores) maximizando o seu uso, além da possibilidade de utilizar tourinhos novos, avaliados por DEP genômica, e que não passariam no processo de criopreservação devido ao momento fisiológico (transição da puberdade para maturidade sexual). Espera-se que essa nova linha de pesquisa avance com contribuições em relação ao melhor diluidor, concentração espermática, tempo e temperatura ideais para prolongar a viabilidade espermática, efeito indivíduo, porcentagens de patologias espermáticas, momento de capacitação espermática e ovulação. Estudos da Embrapa mostram que o aumento da prenhez tem se mantido até 48 horas após a coleta, e que fazendas com logística difícil, como é o caso do Pantanal, mas que investem na compra de touros com genética superior, já utilizam esta biotécnica em escala.

### Agradecimentos

As fazendas parceiras Fazenda BR PEC - Anderson Vargas e Renato Guimarães da Silva, e Fazenda Ema Pantanal Ltda - Daniel Barros Marinho, José Francisco Massoneto, Pablo Storari Loro e Ivo Augusto Cavalieri Alves.

### Referências

- Amann RP, Pickett BW.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci*, v.7, p.145-173, 1987.
- Baruselli PS.** Avaliação do Mercado de IATF no Brasil. *Boletim Eletrônico – VRA*. Edição 1, 19 de fevereiro de 2019. <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra>.
- Borges JC, Silva MR, Guimarães JD, Esper CR, Franceschini, PH.** Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.3, p.303-314, jul./set. 2011. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)
- Borges-Silva JC, Silva MR, Marinho DB, Nogueira E, Sampaio DC, Oliveira LOF, Abreu UGP, Mourão GB, Sartori R.** Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.28 n.7 p.1004-1008, 2016.
- Bucher A, Kasimanickam R, Hall JB, Dejarnette JM, Whittier WD, Kahn W, Xu Z.** Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology*, v.71, n.7, p.1180-1185, 2009.
- Crespilho AM, Nichi M, Guasti PN, Freitas-Dell'Aqua CP, Sá Filho MF, Maziero RR, Freitas-Dell'Aqua JA, Papa FO.** Sperm fertility 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Anim Reprod Sci*, v.146, p.126-133, 2014.
- Crespilho AM, Papa FO, Santos MP, Sá Filho MF.** Use of cooled bull semen as strategy to increase the pregnancy rate in fixed time artificial insemination programs-case report. *Am J Anim Vet Sci*, v.4, n.7, p.175-179, 2012.
- Colégio Brasileiro Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- England GCW.** Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fert*, v.47, p.243-255, 1993.
- Gravance CG, Champion ZJ, Casey PJ.** Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.49, p.1219-1230, 1998.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000.
- Papa MP, Maziero RM, Guasti PN, Junqueira CR, Freitas-Dell'Aqua CP, Papa FO, Viana FP, Alvarenga MA, Crespilho AM, Dell'Aqua Jr. JA.** Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*, 83, 107-113, 8, 2015.
- Parks JE, Lynch DV.** Lipid composition and thermotropic phase behavior of boars, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v.29, p.255-266, 1992.



- Pickett BW, Amann RP.** Cryopreservation of semen. In: Mckinnon AO, Voss JL. Equine reproduction. 1.ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993, 789p.
- Quinn PJ, Chow PYW, White IG.** Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil*, v.60, p.403-407, 1980.
- Resende OA, Alves PAMP, Fajardo RSL, Almeida J, Silva OR, Mello MRB.** Eficiência do sêmen refrigerado na IATF de vacas Girolando. In: Annual Meeting of The Brazilian Embryo Technology Society, 32, Florianópolis. Proceedings... Florianópolis: SBTE, p.209 2018, 2018.
- Silva JCB, Silva MR, Resende OA, Sampaio DC, Nogueira E, Abreu UGPde, Oliveira LOFde, Rodrigues WB, SartoriFilho R.** Sêmen bovino refrigerado e aumento de prenhez de vacas de corte submetidas à IATF. Embrapa Pantanal. CircularTécnica, 114, 9p. 2017. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/169514/1/CT-114.pdf>.
- Silva JCB, Nogueira E, Silva MR.** Processamento de sêmen bovino refrigerado. Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 108, 6p, 2017. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/173024/1/COTJuliana-formatado-final-07fev2018.pdf>
- Silva JCB, Silva MR, Oliveira LOFde, Abreu UGPde, Marinho DB, Sartori R.** Sêmen bovino refrigerado utilizado na IATF contendo ou não glicerol no diluidor. In: Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society, 30, 2016, Foz do Iguaçu. Proceedings... Foz do Iguaçu:SBTE, p.209, 2016. Resumo.
- Tarragó OFB.** Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de prenhez na IATF? Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2017.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, De Kruif A.** Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*, v. 63, n. 3, p. 912-922, 2005.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.481-492, 2000.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
- Watson PF.** The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fert*, v.62, p.483-492, 1981.
- Yang DH, Standley NT, Xu ZZ.** Application of liquid semen technology under the seasonal dairy production system in New Zealand. *Anim. Reprod Sci*, v.194, p.2-10, 2018.
-